

50376
1278
73

ccogen 20100991

50376
1994
73

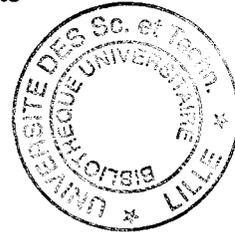
UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE FLANDRES-ARTOIS

N° Ordre: 1278

MERCIER Corinne

Thèse de Doctorat
Sciences de la Vie et de la Santé

Titre:



***TOXOPLASMA GONDII* :**
**CARACTERISATION MOLECULAIRE D'UN ANTIGENE DE
GRANULES DENSES (GRA2). MISE EN EVIDENCE DES
PROMOTEURS DE TRANSCRIPTION DES GENES CODANT POUR
LES PROTEINES GRANULAIRES GRA1, GRA2, GRA5 ET GRA6.**

Soutenu le 18 février 1994

Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire
INSERM U167-CNRS 624
Institut Pasteur de Lille

Président : - Pr. Steven BALL
Rapporteurs: - Dr. Camille LOCHT
- Dr. Etienne PAYS
Examineurs: - Pr. André CAPRON
- Dr Marie-France CESBRON-DELAUW

En mémoire de mon père
En mémoire de mon oncle

Je dédie cette thèse
à ma mère,
à ma famille,
à mes amis,
en témoignage de mon affection.

Ce travail a été réalisé au

Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire

Unité Mixte INSERM U167-CNRS 624

Institut Pasteur de Lille

1 rue du Pr. A. Calmette

59019 LILLE

sous la direction de Monsieur le Professeur A. CAPRON.

Il a fait l'objet d'une collaboration avec le

Service de Biochimie des Macromolécules
dirigé par Monsieur le Professeur A. TARTAR.

CNRS URA 1309

Institut Pasteur de Lille

A Monsieur le Professeur André CAPRON,

Vous m'avez accueillie au sein de votre laboratoire et m'avez permis d'y réaliser ce travail. Vous m'avez apporté votre soutien tout au long de ces années. Que cette thèse soit la preuve de ma reconnaissance et de ma respectueuse admiration.

A Monsieur le Professeur Steven BALL,

Vous avez accepté spontanément de juger ce travail ainsi que d'assurer la présidence de ce jury. Je tiens à vous exprimer mes très sincères remerciements.

A Monsieur le Docteur Etienne PAYS,

Vous me faites l'honneur de bien vouloir juger ce travail. Soyez assuré de ma gratitude. C'est aussi avec un très grand plaisir que je vous compte parmi les membres de ce jury.

A Monsieur le Docteur Camille LOCHT,

Vous avez au cours de ces dernières années, manifesté votre intérêt pour notre travail. Vous nous avez fait profiter de votre expérience et de vos conseils. Je tiens à vous en remercier très sincèrement.

A Madame le Docteur Marie-France CESBRON-DELAUW,

Vous m'avez accueillie au sein du groupe de recherche que vous dirigez. Vous avez été à l'origine de ce travail, l'avez suivi quotidiennement avec compétence, vigilance, dynamisme et aussi beaucoup d'enthousiasme. Durant ces années, vous m'avez toujours aidée, soutenue et encouragée. Je vous dois beaucoup et je voudrais aujourd'hui vous remercier pour tout ce que vous m'avez apporté.

A Mademoiselle le Docteur **Laurence Lecordier**,

Nous avons travaillé très souvent sur des projets communs et ce fut toujours pour moi un très grand plaisir que de travailler avec toi, Laurence. Je voudrais aussi te remercier pour l'aide et le soutien que tu m'as apportés, en particulier durant les derniers mois.

A mesdames les Docteurs **Catherine Lemaire, Geneviève Renaud, Béatrice Tourvieille et Claudie Verwaerde**,

Vous avez suivi ce travail depuis le début et m'avez apporté des conseils judicieux au cours d'échanges quotidiens particulièrement sympathiques. Veuillez accepter aujourd'hui mes très sincères remerciements.

A Madame et Monsieur les Docteurs **Florence Miquey et Gary Garber**,

C'est toi, Florence, qui avec une infinie patience, beaucoup de pédagogie et autant de gentillesse, m'a initiée à la biologie moléculaire. Que cette thèse soit l'occasion pour moi de t'en remercier.

Durant vos six mois sabbatiques passés dans notre laboratoire, Gary, vous m'avez apporté votre aide et votre soutien quotidiennement. Votre dynamisme, votre enthousiasme et votre bonne humeur ont été tout autant appréciés.

A Mesdames les Docteurs **Anne Decoster et Pierrette Maes**,

Une part non négligeable de ce travail n'aurait pu être réalisée sans votre aide. Soyez assurées de ma reconnaissance.

Je voudrais également associer à ces remerciements :

les Docteurs J. Y. Cesbron, F. Darcy, R. J. Pierce et E. Porchet pour les conseils qu'ils m'ont apportés ;

le Docteur J.P. Kursnierz non seulement pour la synthèse des oligonucléotides mais également pour sa bonne humeur ;

Mesdames et Messieurs A. Caron, D. Deslée, J. Fontaine, M. P. Fourmaux, F. Mullier et I. Ricard pour leur aide technique, leurs conseils ou tout simplement leur soutien et leur gentillesse ;

Monsieur le Docteur M. Joseph, Madame J. Deryck et les bibliothécaires de l'Institut pour leur précieuse collaboration dans l'obtention des supports bibliographiques ainsi que Monsieur C. Drolez pour la réalisation des photographies illustrant ce mémoire ;

le personnel des secrétariats et de la production des parasites pour leur grande disponibilité ;

l'ensemble du personnel de l'unité et plus particulièrement le groupe "Protozoologie".

Les résultats présentés dans ce mémoire ont fait l'objet des publications et communications suivantes:

Publications:

- Cesbron-Delauw M. F., Boutillon C., Mercier C., Fourmaux M. P., Murray A., Miquey F., Tartar A. and A. Capron. 1992. Amino acid sequence requirements for the epitope recognized by a monoclonal antibody reacting with the secreted antigen G.P.28.5 of *Toxoplasma gondii*. Mol. Immunol. 29: 1375-1382.

- Mercier C., Lecordier L., Darcy F., Deslée D., Murray A., Tourvieille B., Maes P., Capron A. and M. F. Cesbron-Delauw. 1993. Molecular characterization of a dense granule antigen (GRA2) associated with the network of the parasitophorous vacuole in *Toxoplasma gondii*. Mol. Biochem. Parasitol. 58: 71-82.

- Lecordier L., Mercier C., Torpier G., Tourvieille B., Darcy F., Liu J., Maes P., Tartar A., Capron A. and M. F. Cesbron-Delauw. 1993. Molecular structure of a *Toxoplasma gondii* dense granule antigen (GRA5) associated with the parasitophorous vacuole membrane. Mol. Biochem. Parasitol. 59: 143-154.

- Cesbron-Delauw M. F., Mercier C., Lecordier L., Darcy F. and A. Capron. 1993. Dense granule antigens of *Toxoplasma gondii*. in *Toxoplasmosis*. NATO ASI Series, Vol. H78, ed. by J. E. Smith. pp 33-41.

- Murray A., Mercier C., Decoster A., Lecordier L., Capron A. and M. F. Cesbron-Delauw. 1993. Multiple B-cell epitopes in a recombinant GRA2 secreted antigen of *Toxoplasma gondii*. Applied Parasitol. 34: 235-244.

- Mercier C., Garber G. E., Lecordier L., Beauchamps P., Capron A. and M. F. Cesbron-Delauw. Cis-acting elements in the promoter region of genes encoding 4 dense granule proteins in *Toxoplasma gondii*. (In preparation: Mol. Cell. Biol.).

- Lecordier L., Dubremetz J. F., Tourvieille B., Moleon I., Mercier C., Deslée D., Capron A. and M. F. Cesbron-Delauw. Characterization of a dense granule antigen of *Toxoplasma gondii* (GRA6) associated to the network of the parasitophorous vacuole. (In preparation: Mol. Biochem. Parasitol.)

Communications et posters:

- Mercier C., Garber G. E., Beauchamps P., Lecordier L., Capron A. and M. F. Cesbron-Delauw. *Toxoplasma gondii* : caractérisation des promoteurs des gènes codant pour des protéines de granules denses (GRA1, GRA2 et GRA5). Communication orale. XXXII^{ème} réunion annuelle du Groupement des Protistologues de Langue Française, La Grande Motte, 20-23 Mai 1993.

- Mercier C., Garber G. E., Beauchamps P., Lecordier L., Capron A. and M. F. Cesbron-Delauw. *Toxoplasma gondii*: Characterization of the promoters of genes encoding 3 dense granule antigens, GRA1, GRA2 and GRA5. Communication orale. IX International Congress of Protozoology, Berlin, 25 juillet-01 Août 1993.

- Mercier C., Garber G. E., Beauchamps P., Lecordier L., Capron A. and M. F. Cesbron-Delauw. *Toxoplasma gondii*: identification of the promoter site of genes encoding 3 dense granule antigens, GRA1, GRA2 and GRA5. Poster. Infectious Diseases Society of America. Annual Meeting, New Orleans, LA, 15-17 octobre 1993.

L'ensemble des résultats concernant la purification de l'antigène natif GRA2, la protection assurée par la molécule native ainsi que la caractérisation moléculaire du gène a fait l'objet d'une demande de dépôt d'un brevet d'invention (brevet N° 92.07206 déposé le 15/06/1992).

La séquence nucléotidique du gène codant pour GRA2 a été soumise auprès de la banque de données GenBankTM avec le numéro d'accession U01753.

La caractérisation des promoteurs des gènes *GRA1*, *GRA2*, *GRA5* et *GRA6* a fait l'objet d'une demande de dépôt de brevet d'invention (brevet N° 93.13315 déposé le 20/12/93).

PLAN

	Page
RESUME	12
<u>1ère partie : GENERALITES</u>	14
- Introduction	15
- Généralités	17
- But du travail	55
<u>2ème partie : RESULTATS</u>	56
-I- Caractérisation moléculaire de l'antigène GRA2	57
-II- Etude de l'immunogénicité et de l'antigénicité des polypeptides GRA1 et GRA2 recombinants	74
-III- Identification du promoteur de transcription des gènes <i>GRA1, GRA2, GRA5</i> et <i>GRA6</i>	100
<u>3ème partie : CONCLUSION</u>	131
<u>4ème partie : MATERIEL ET METHODES</u>	141
-I- Clonage du gène codant pour l'antigène GRA2	142
-II- Production et purification des protéines parasitaires natives et recombinantes	149
-III- Cartographie des épitopes B par la technique ELISA	158
-IV- Etude des promoteurs de transcription des gènes <i>GRA1, GRA2, GRA5</i> et <i>GRA6</i>	160
<u>5ème partie : BIBLIOGRAPHIE</u>	168
SOMMAIRE	196

ABREVIATIONS

- a. a.** : acide aminé
- AcMc** : Anticorps Monoclonal
- AIF** : Adjuvant Incomplet de Freund
- ATP** : Adénosine Tri Phosphate
- BSA** : Bovine Sérum Albumin (Sérum Albumine Bovine)
- CAT** : Chloramphénicol Acétyl Transférase
- CHAPS** : (3-(3-cholamidopropyl)-diméthylammonio)-propansulfonate)
- c.p.m.** : coups par minute
- DMSO** : DiMéthylSulfOxyde
- DO** : Densité Optique
- DTT** : Di Thio Thréitol
- EDTA** : Acide Ethylène Diamine Tétracétique
- ELISA** : Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
- ESA** : Excreted-Secreted Antigen (Antigène d'Excrétion-Sécrétion ou AES)
- HEPES** : Acide N-2-Hydroxyéthyl Pipérazine N'-2 Ethane Sulfonique
- HPLC** : High Pressure Liquid Chromatography
- IFN** : Interféron
- Ig** : Immunoglobuline
- IL** : Interleukine
- IPTG** : IsoPropyl- β -D-Thio-Galactopyranoside
- kDa** : kiloDalton
- MEM** : Milieu Essentiel Minimum
- MOPS** : (3-[N-Morpholino]propane Sulfonic Acid)
- pb** : paire de bases
- PBS** : Phosphate Buffered Saline (Tampon Phosphate 0.01 M, NaCl 0.9%)
- PCR** : Polymerase Chain Reaction
- PEG** : Poly Ethylène Glycol
- P.M.** : Poids Moléculaire
- PMSF** : Fluorure de Phényl Méthyl Sulfonyle
- r.p.m.** : rotation par minute
- SDS-PAGE** : SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis
- SVF** : Sérum de Veau Foetal
- TFA** : Tri Fluoro Acetic acid
- TLCK** : N- α -p-tosyl-L-Lysine chlorométhyl cétone
- TPCK** : N-tosyl-L-Phénylalanine chlorométhyl cétone

RESUME

Les protéines GRA, stockées dans les organelles de sécrétion de *Toxoplasma gondii* appelées granules denses, sont sécrétées dans la vacuole parasitophore lors de l'invasion de la cellule-hôte par le parasite. A l'interface entre le protozoaire et la cellule qui l'abrite, elles pourraient jouer un rôle primordial pour la survie et la multiplication intracellulaires du Toxoplasme.

Parmi les molécules GRA, un composé de 28 kDa (P28 ou GRA2) présente une bonne immunogénicité tant chez l'homme que chez l'animal. Cet antigène est exprimé à la fois par le stade invasif du parasite (tachyzoïte) et par le stade quiescent (bradyzoïte) contenu dans des kystes ; la protection qu'il induit dans les différents modèles expérimentaux de la toxoplasmose permet de le considérer comme un candidat vaccinal potentiel. Au cours de ce travail, nous avons entrepris la caractérisation moléculaire de la protéine GRA2. Le clonage et le séquençage de clones d'ADNc et d'un clone génomique ont montré que le gène *GRA2* (1.3 Kb), probablement unique dans le génome du Toxoplasme, est composé de deux exons séparés par un intron de 241 pb. Le messenger unique est long de 1.2 Kb. Le polypeptide déduit de la séquence en ADNc (185 acides aminés, 19.8 kDa) contient de nombreux résidus Sérine et Thréonine qui pourraient être le lieu de la O-glycosylation mise en évidence sur la protéine native. Cinq séquences peptidiques obtenues par le microséquençage de polypeptides issus de la digestion trypsique de la protéine native purifiée par HPLC confirment la séquence déduite du cadre de lecture de l'ADNc et en particulier, les sites d'épissage de l'intron. Les 23 acides aminés N-terminaux de la protéine possèdent les caractéristiques d'un peptide signal. Le domaine central de la chaîne polypeptidique pourrait être arrangé sous forme de deux α -hélices amphipathiques qui seraient les structures responsables de l'association de la protéine GRA2 aux membranes du réseau intravacuolaire.

L'expression de la protéine sous forme recombinante fusionnée et l'utilisation des peptides recombinants ainsi que de peptides synthétiques dans un système ELISA direct ont permis de montrer que la protéine GRA2 contient au moins trois épitopes B reconnus par les sérums humains d'infection chronique et aiguë. Un de ces épitopes, constitué des 15 acides aminés C-terminaux de la protéine, est aussi reconnu par l'anticorps monoclonal TG17-179. Le même système d'expression, appliqué à la protéine de granules denses GRA1, a également permis de souligner l'intérêt diagnostique de ce dernier composant.

Afin de mettre en évidence les promoteurs de transcription des gènes de granules denses, les régions 5' des gènes *GRA1* (379 pb), *GRA2* (276 pb), *GRA5* (209 pb) et *GRA6* (265 pb) ont été clonées devant le gène bactérien codant pour la Chloramphénicol Acétyl Transférase et la région 3' non traduite du gène *SAG1* (codant pour l'antigène majeur de surface du Toxoplasme). Ces régions permettent l'expression d'une activité CAT après transfection transitoire de tachyzoïtes par électroporation. L'analyse de mutants de délétion a permis de localiser les régions promotrices des gènes *GRA* dans le proche environnement du

site de démarrage de la transcription (-107 à -47 pour *GRA1*, -73 à -37 pour *GRA2*, -51 à -13 pour *GRA5* et -85 à -27 pour *GRA6*). L'analyse de la séquence de ces régions promotrices a mis en évidence la présence d'un motif CAAT (-76 à -71) en amont du gène *GRA1* et de deux motifs répétés et riches en purines (A/TGAGACG) en amont des 4 gènes. La transfection de constructions hybrides dans lesquelles les régions 5' non traduites des gènes *GRA1* et *GRA6* ont été perméées, montre que ces régions participent aussi au contrôle de l'expression des protéines GRA.

1ère PARTIE

GÉNÉRALITÉS

INTRODUCTION

La toxoplasmose est certainement l'affection parasitaire la plus répandue dans le monde. Causée par le protozoaire intracellulaire *Toxoplasma gondii*, cette parasitose infecte l'homme sous toutes les latitudes ; elle est aussi responsable d'importantes pertes financières dans les zones d'élevage, la toxoplasmose congénitale des ovins constituant un problème de santé vétérinaire majeur.

En pathologie humaine, c'est essentiellement dans les situations où le système immunitaire est déficient que l'infection par *T. gondii* est lourde de conséquences. En effet, chez le fœtus, la contamination par voie transplacentaire peut entraîner des foetopathies sévères ou même la mort *in utero*. De même, l'encéphalite toxoplasmique complique fréquemment l'évolution des malades atteints d'un déficit immunitaire acquis (SIDA).

Le caractère intracellulaire obligatoire du parasite nécessite pour celui-ci l'élaboration de mécanismes de défense particuliers pour se protéger des processus mis en oeuvre par l'hôte afin de limiter et de contrôler l'infection. L'équilibre qui s'établit ainsi entre le protozoaire et son hôte reposerait sur la notion d'immunité de prémunition qui implique l'expression d'épitopes communs aux différents stades de développement du parasite (Capron and Dessaint, 1988). Cette immunité pourrait être le fait d'une stimulation répétée du système immunitaire de l'hôte par des antigènes exprimés par les formes parasitaires enkystées (bradyzoïtes) qui maintiendraient alors une réponse immunitaire efficace contre les formes d'invasion (tachyzoïtes).

Les conséquences sévères de la toxoplasmose humaine et animale justifient l'intensification des programmes de recherche à but diagnostique et immunoprophylactique. Les composants des Antigènes d'Excrétion-Sécrétion (AES) semblent, selon les hypothèses énoncées ci-dessus, constituer de bons candidats pour la réalisation d'un vaccin de constitution définie, composé de plusieurs molécules recombinantes et/ou d'un mélange de peptides (Darcy, Deslée et al., 1988 ; Decoster, Darcy et al., 1988 ; Ridet, Auriault et al., 1988 ; Duquesne, Auriault et al., 1990 ; Darcy, Maes et al., 1992). Parmi ces AES, trois antigènes de 23, 28 et 21 kDa, respectivement nommés GRA1, GRA2 et GRA5 (Sibley, Pfefferkorn et al., 1991) sont communs aux stades tachyzoïte et bradyzoïte (Darcy, Charif et al., 1990). Ils sont stockés dans des organites sécrétoires du Toxoplasme appelés granules denses et sont libérés dans la vacuole parasitophore après l'invasion de la cellule-hôte (Charif, Darcy et al., 1990).

Dans ce contexte, nos travaux se sont orientés selon trois axes principaux.

Le clonage du gène codant pour GRA2 nous a permis dans un premier temps, d'établir la structure moléculaire de l'antigène et d'émettre des hypothèses quant à la relation entre la structure de la molécule et son trafic intracellulaire. L'expression de l'antigène recombinant sous sa forme entière ou sous des formes tronquées a permis dans un second temps, de mettre en évidence l'existence d'au moins trois épitopes B dans la molécule GRA2, épitopes reconnus par les sérums humains d'infection. Enfin, d'un point de vue plus fondamental, l'utilisation de la technique de transfection transitoire du Toxoplasme nous a permis d'identifier les motifs génomiques responsables de l'initiation de la transcription des gènes *GRA1* (Cesbron-Delauw, Guy et al., 1989), *GRA2*, *GRA5* (Lecordier, Mercier et al., 1993) et *GRA6* (Lecordier, Dubremetz et al., in preparation).

GENERALITES

C'est en 1908, à l'Institut Pasteur de Tunis, que *Toxoplasma gondii* a été observé pour la première fois par Nicolle et Manceau, chez un rongeur, le gondi (Nicolle and Manceaux, 1908). Le Toxoplasme doit son nom à sa forme arquée ("Toxon" en grec) (Nicolle and Manceaux, 1909). Il fut découvert simultanément au Brésil, chez un lapin, par Splendore (Splendore, 1908)(Splendore, 1909).

Ce parasite est resté une curiosité de laboratoire jusqu'en 1923, date à laquelle il fut découvert dans les yeux d'un enfant mort d'hydrocéphalie (Janku, 1923). Finalement, ce n'est qu'en 1970, que la totalité du cycle fut élucidée (Hutchison, Dunachie et al., 1969 ; Frenkel, Dubey et al., 1970 ; Sheffield and Melton, 1970).

Il n'existe toujours à l'heure actuelle qu'une seule espèce de Toxoplasmes. Ce protozoaire (organisme eucaryote unicellulaire) fait partie du sous-règne des Protistes. Il est classé selon Levine (Levine, Corliss et al., 1980), dans le phylum des *Apicomplexa*, la classe des *Sporozoea*, la sous-classe des *Coccidia*, l'ordre des *Eucoccidiida*, le sous-ordre des *Eimeriina* aux côtés de *Isospora* et *Sarcocystis* (Levine, 1982) et la famille des *Toxoplasmodae*.

Cycle parasitaire (Dubey and Beattie, 1988) **(Figure 1)**

Ce protozoaire intracellulaire obligatoire possède de nombreux hôtes intermédiaires (tous les animaux à sang chaud) mais un seul hôte définitif, le chat (Joyner, 1982). Le cycle évolutif complet du Toxoplasme (phase asexuée et sexuée) n'intervient que chez l'hôte définitif. Un cycle incomplet ne faisant intervenir que la phase asexuée se déroule par contre chez tous les hôtes intermédiaires.

- Cycle sexué

L'hôte définitif, le chat, s'infeste le plus souvent par ingestion de kystes (carnivorisme de petits rongeurs par exemple) ou d'oocystes. Leur paroi est détruite par les enzymes protéolytiques de l'estomac et de l'intestin grêle. Les **bradyzoïtes** ou **sporozoïtes** ainsi libérés pénètrent dans les cellules épithéliales de l'intestin à l'intérieur desquelles ils se multiplient par schizogonie (multiplication asexuée). Les **schizontes** donnent naissance, par division du cytoplasme, à des mérozoïtes qui évoluent en gamétocytes. Le stade de fécondation des **macrogamètes** femelles par les **microgamètes** mâles a lieu au niveau des microvillosités des cellules de l'épithélium intestinal. Les **oocystes** qui résultent de cette fécondation sont des

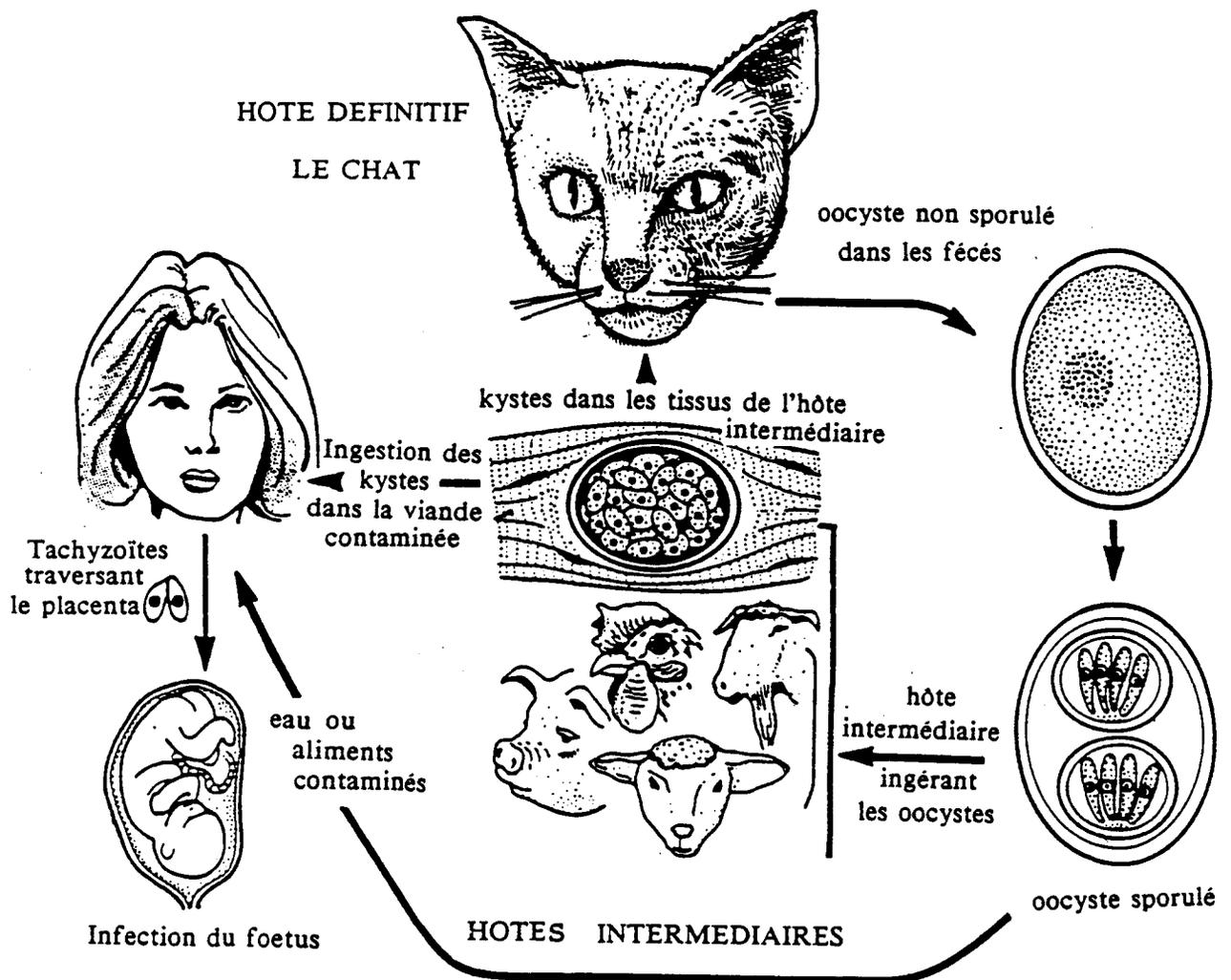


Figure 1 : Cycle évolutif de *Toxoplasma gondii* (d'après Dubey et Beattie. 1988)

formes de résistance du parasite : ils sont libérés dans le milieu extérieur avec les fécès du chat. La sporulation des oocystes produit 8 sporozoïtes infestants.

- Cycle asexué

Le cycle asexué qui se déroule chez les hôtes intermédiaires, résulte de l'ingestion de **kystes** contenus dans la viande parasitée ou d'**oocystes** présents dans les aliments souillés de terre. Les formes parasitaires infestantes, **bradyzoïtes** ou **sporozoïtes**, sont libérés au niveau de l'intestin après digestion de la paroi du kyste ou de l'oocyste. Les parasites se différencient ensuite rapidement en **tachyzoïtes** et se disséminent par voie sanguine et lymphatique dans tout l'organisme. Les premiers kystes contenant les bradyzoïtes sont ensuite observés 10 à 15 jours après l'ingestion d'oocystes (Freyre, Dubey et al., 1989).

I- LA TOXOPLASMOSE

Différentes formes de différenciation parasitaire sont détectées au cours du cycle évolutif mais trois stades sont infectieux : seuls les tachyzoïtes (formes prolifératives), les bradyzoïtes (formes quiescentes contenues dans des kystes) et les sporozoïtes contenus dans des oocystes sont capables d'envahir les cellules.

1- La maladie

La proportion de la population infectée varie selon les pays de 20 à 90%. Elle serait en France, supérieure à 75%. D'une façon plus générale, elle semblerait plus fréquente dans les zones d'origine du chat (Europe et Afrique) (Dupouy-Camet, Gavinet et al., 1993).

Après digestion de la paroi des kystes/oocystes par les enzymes gastriques et intestinales, les bradyzoïtes ou les sporozoïtes libérés se différencient en tachyzoïtes qui se disséminent dans tout l'organisme. Chez les sujets immunocompétents, l'installation d'une réponse immunitaire efficace vient contrôler la parasitémie et le stade d'infection aiguë passe même souvent inaperçu : les parasites s'enkystent rapidement dans les organes peu accessibles aux défenses immunitaires (système nerveux central, yeux, muscles striés et cardiaque) et les kystes persistent durant toute la vie de l'hôte (Ambroise-Thomas and Garin, 1984). Cependant, dans les cas de déficience ou d'immaturité du système immunitaire, la toxoplasmose peut se révéler lourde de conséquences pour l'individu infecté (Ambroise-Thomas and Pelloux, 1993b).

- Immunodéficiences

Chez les sujets immunodéficients, une primo-infection ou le plus souvent, la réactivation d'une toxoplasmose acquise par rupture de kystes, a souvent des conséquences tragiques. *T. gondii* est responsable par exemple, en terme de fréquence, de la seconde infection opportuniste liée au VIH après la pneumocystose pulmonaire (Morlat, Ragnaud et

al., 1993). Cette infection conduit très souvent à la mort par encéphalite toxoplasmique due à une recrudescence de l'infection toxoplasmique. En France, la fréquence annuelle de la toxoplasmose cérébrale varie de 9,5 à 18% des cas de SIDA : plus de 3.000 cas ont été rapportés pour les 20.000 cas de SIDA à la date de juin 92 (Anonyme, 1992). En Europe, les réactivations toxoplasmiques toucheraient plus de 25% des patients atteints de SIDA (Leport and Remington, 1992). Des lésions au niveau des yeux (Bloch-Michel, Couvreur et al., 1992), de la moëlle épinière (Herskowitz, Siegel et al., 1989) et des poumons (Leport and Remington, 1992 ; Derouin and Garin, 1993) peuvent être observées. Par contre, aucune recrudescence des kystes n'a été observée dans les muscles.

- Toxoplasmose congénitale

Les premiers cas de toxoplasmose congénitale ont été décrits par Sabin en 1941 (Sabin, 1941). Elle est due à la contamination du fœtus *in utero* après passage du parasite au travers de la barrière placentaire, ceci en cas de primo-infection de la mère pendant sa grossesse. Le nombre des toxoplasmoses congénitales serait compris entre 700 et 3.000 par an en France (soit 1 à 3 cas pour 1.000 naissances) (Dupouy-Camet, Gavinet et al., 1993). La gravité des atteintes est cependant variable en fonction de l'âge du fœtus lors de la contamination : bien que plus rare, le passage du parasite en début de grossesse peut être responsable d'atteintes céphaliques particulièrement graves ou même de la mort du fœtus *in utero* (Ambroise-Thomas and Garin, 1984). Par contre, l'atteinte tardive du fœtus au cours de la grossesse, peut se traduire par une toxoplasmose congénitale latente. Une rechute peut cependant survenir même après de très longs délais, généralement lors de la puberté. Les manifestations oculaires sont alors très fréquentes (Ambroise-Thomas and Pelloux, 1993a ; Ambroise-Thomas and Pelloux, 1993b)

2- Le diagnostic

Les signes cliniques d'une toxoplasmose aiguë sont généralement rares ; aussi, le diagnostic repose-t-il sur la mise en évidence d'anticorps spécifiques pour dater l'infection ou sur la détection du parasite lui-même.

- Diagnostic sérologique

La France est l'un des premiers pays où le suivi sérologique mensuel des femmes enceintes séronégatives a été rendu obligatoire (Décret du 14 février 1992). L'établissement d'un diagnostic repose sur l'emploi d'au moins deux types de méthodes différentes.

Le test de référence en la matière reste le "Dye Test" (Sabin, 1949) ou test de lyse des parasites en présence de complément, par activation de la voie classique (Schreiber and Feldman, 1980). L'immunofluorescence indirecte sur parasites fixés a également été très utilisée. Une meilleure connaissance des composantes humorales de la réponse immunitaire et des antigènes du parasite a permis la mise au point de nombreux tests ELISA ou ISAGA.

Ainsi, un diagnostic fiable de la toxoplasmose aiguë chez la mère et le nouveau-né repose aujourd'hui sur la recherche d'IgA spécifiques, marqueurs de cette phase aiguë (Stepick-Biek, Thulliez et al., 1990 ; Decoster, Slizewicz et al., 1991). Ce test semble également très sensible pour détecter une toxoplasmose aiguë ou la réactivation d'une toxoplasmose acquise chez les patients atteints de SIDA (Darcy, Fourdrinier et al., 1992). Les IgM par contre, ne sont pas toujours détectées au cours de la toxoplasmose aiguë (Decoster, Darcy et al., 1988 ; Stepick-Biek, Thulliez et al., 1990) ou peuvent persister très longtemps au delà de la cette première phase (Decoster, Darcy et al., 1988). Les IgE quant à elles, seraient également de bons marqueurs de la phase précoce (Pinon, Toubas et al., 1990).

La qualité des tests de diagnostic devrait maintenant bénéficier des acquis du clonage d'antigènes à potentialités diagnostiques, par l'utilisation de molécules recombinantes (Johnson, Illana et al., 1989 ; Johnson and Illana, 1991 ; Parmley, Sgarlato et al., 1992 ; van Gelder, Bosman et al., 1993 ; Murray, Mercier et al., 1993).

- Détection directe du parasite

La présence de Toxoplasmes vivants dans les prélèvements biologiques peut être détectée par mise en culture des parasites *in vitro* ou par inoculation à la souris. Les toxoplasmoses pulmonaires peuvent également être mises en évidence par observation microscopique des liquides de lavage broncho-alvéolaire (Derouin, Sarfati et al., 1989 ; Dumon, Herin et al., 1990). Ces méthodes restent cependant lourdes, peu rapides et donc inadaptées lorsque par exemple, la décision d'avortement thérapeutique doit être prise rapidement si une toxoplasmose congénitale est soupçonnée. La détection des antigènes parasitaires présents dans le sang pourrait constituer une solution de remplacement (Hughes and van, 1982 ; Hassl and Aspöck, 1990). La Nucléoside TriPhosphate Hydrolase (NTPase) pourrait représenter un bon candidat (Asai, Mizuno et al., 1992).

Les apports de la biologie moléculaire se sont traduits par la mise au point d'une nouvelle génération de tests de diagnostic basés sur l'amplification par Polymerase Chain Reaction (PCR) de fragments géniques du Toxoplasme. Cette technique est par exemple tout à fait appropriée dans les cas de SIDA. Dans ce cas en effet, la sérologie classique est peu informative et la mise en évidence directe du parasite est nécessaire (Pelloux, Picot et al., 1993). Différentes sondes ont ainsi été testées, issues de gènes présents dans le génome sous une seule copie (gène P30 ; Burg, Perelman et al., 1988 ; Savva, 1989 ; Savva, Morris et al., 1990) ou issues de gènes répétés (Blanco, Angel et al., 1992) (gène B1 répété 35 fois ; Burg, Grover et al., 1989 ; Parmley, Goebel et al., 1992; séquence anonyme TGR1E ; Cristina, Liaud et al., 1991 ; Cristina, Derouin et al., 1992; Cristina, Pelloux et al., 1993 ; gène de l'ARN ribosomal 18 S répété 100 fois ; Cazenave, Bessières et al., 1990 ; gène de l'ARN 5S ; Guay, Dubois et al., 1993). La fiabilité de ces tests dans le diagnostic de la toxoplasmose congénitale (Cazenave, Forestier et al., 1992) ou de l'encéphalite toxoplasmique reste cependant encore à améliorer (Holliman, Johnson et al., 1990 ; Grover, Thulliez et al., 1990 ; Parmley, Goebel et al., 1992).

Le diagnostic des formes cérébrales de la toxoplasmose, notamment au cours du SIDA, a également largement bénéficié des apports de l'imagerie médicale (Ambroise-Thomas and Pelloux, 1993a).

3- Prévention et traitements

La connaissance des modes de contamination et de l'incidence de la toxoplasmose dans les différents groupes à risques a permis de mettre en place des méthodes de **prévention**, notamment contre la toxoplasmose congénitale. Une surveillance régulière de la sérologie durant la grossesse ainsi que la prescription de conseils d'hygiène (pas de viande crue, lavage des fruits et légumes, pas de contacts avec les chats...) n'ont cependant pas fait baisser significativement, du moins en France, l'incidence des séroconversions chez les femmes enceintes non prémunies (1,1 à 1,8% dans les années 1960-70 contre 0,4 à 1,1% dans les années 87-88). Le traitement systématique par la spiramycine, en cas de séroconversion, semble par contre avoir diminué l'incidence de l'infection transplacentaire (Dupouy-Camet, Gavinet et al., 1993).

De nombreuses **drogues** ont été testées jusqu'à ce jour pour traiter la toxoplasmose. Elles ont pour but d'agir au niveau des voies métaboliques du parasite. La voie de synthèse des folates, faisant intervenir la DHPS et la DHFR (déhydroptéroate synthétase et déhydrofolate réductase) est inhibée par les sulfamides et la pyriméthamine. La carence en folates est responsable, secondairement, d'altérations de la synthèse des bases puriques et de troubles de la division parasitaire. L'association pyriméthamine-sulfadiazine dont l'efficacité thérapeutique a été démontrée dans des modèles d'infection aiguë, est l'arme la plus efficace. Elle permet de diminuer la parasitémie mais ne permet pas l'éradication des kystes. Malgré les nombreux effets secondaires observés, elle est couramment employée pour le traitement des femmes enceintes et des patients immunodéprimés (Fortier and Ajana, 1992 ; Leport and Remington, 1992 ; Derouin, Chau et al., 1993).

L'émimycine qui s'intercale dans les acides nucléiques peut également inhiber la multiplication du parasite mais l'isolement d'un mutant résistant à cette drogue empêche son utilisation à grand échelle en médecine humaine (Pfefferkorn, Eckel et al., 1989).

La synthèse des protéines parasitaires est quant à elle, perturbée par les macrolides et les cyclines (Derouin, Chau et al., 1993).

L'**IFN γ** est la principale cytokine produite au cours de la toxoplasmose. Elle présente un effet synergique avec la pyriméthamine et la clindamycine (Israelski and Remington, 1990). Son emploi dans le traitement de l'encéphalite toxoplasmique est envisagé (Leport and Remington, 1992 ; Suzuki and Remington, 1993).

De nombreux problèmes restent cependant à envisager pour la mise en place d'une stratégie thérapeutique efficace. Aucune étude n'a par exemple vérifié qu'une drogue active dans le cytoplasme de la cellule infectée l'est également dans la vacuole parasitophore. La

différence génotypique et phénotypique des souches de toxoplasmes est aussi à considérer. En outre, il est important de noter que la toxoplasmose est généralement associée à d'autres infections opportunistes chez les malades immunodéprimés.

II- IMMUNITE ANTI-TOXOPLASMIQUE

Chez l'individu immunocompétent, la phase aiguë de la maladie est rapidement contrôlée. En effet, l'enkystement rapide du parasite dans les muscles et le système nerveux le met à l'abri des atteintes de la réponse immune spécifique qui se développe parallèlement à l'enkystement.

Cette réponse immune fait intervenir à la fois des composants humoraux et cellulaires ; la part prépondérante de l'immunité à médiation cellulaire est cependant maintenant admise (Johnson, 1990b). Cette immunité acquise lors de la primo-infestation permet le contrôle de la réactivation ultérieure des parasites enkystés ; elle assurerait également la protection totale et définitive contre toute réinfection. Elle pourrait donc être qualifiée d'immunité de prémunition (Capron and Dessaint, 1988).

1- Immunité humorale

Les **anticorps circulants**, outre le fait qu'ils constituent de bons marqueurs sérologiques de la maladie représentent une première barrière de défense mise en place par l'organisme infecté contre les tachyzoïtes extra-cellulaires.

Ils interviennent ainsi, en coopération avec le complément, pour **lyser le parasite**. De plus, en opsonisant les parasites, ils facilitent la phagocytose réalisée par les macrophages : la fusion de la vacuole parasitophore avec les lysosomes et l'acidification de cette vacuole entraîne la destruction des parasites (Sethi, Endo et al., 1981). L'augmentation de l'activité oxydative des macrophages, corrélée à l'activation de la NADPH oxydase, serait en partie responsable de la destruction des parasites (de Carvalho and de Souza, 1989). Les anticorps participent également aux mécanismes d'ADCC (Antibody-Dependent-Cellular-Cytotoxicity) : ils "arment" les cellules responsables de la lyse des parasites (macrophages, plaquettes,...) (Ridel, Auriault et al., 1988).

Les anticorps d'isotype **IgM** apparaissent précocément au cours de l'infection (7^{ème} jour), atteignent leur taux maximum en quelques semaines puis diminuent rapidement ; ils peuvent cependant persister plusieurs années chez certains individus et sont de ce fait, parfois responsables de tests sérologiques faussement positifs. Les **IgG** apparaissent dans les 1 à 12 mois suivant le début de l'infection et atteignent leur valeur maximale après 6 semaines environ. Des taux résiduels, signes de protection contre toute réinfection, sont ensuite détectés

durant toute la vie. Les **IgE** d'apparition très précoce au cours de la maladie permettent de dater assez précisément l'infection (Wong, Hajd et al., 1993) et trouvent donc une application dans le diagnostic de la toxoplasmose congénitale (Pinon, Toubas et al., 1990). Elles sembleraient reconnaître préférentiellement l'antigène majeur de surface du tachyzoïte (P30 ou SAG1 ; Darcy, Maes et al., 1992 ; Darcy, Torpier et al., 1992).

L'homme se contaminant principalement par voie orale, l'importance des anticorps d'isotype **IgA** et de l'**immunité mucoale** a été récemment recherchée (Chardès, Velge-Roussel et al., 1993 ; Chardès and Bout, 1993). La cinétique de la réponse IgA a été clairement établie dans les sérums de souris (Chardès, Bourguin et al., 1990 ; Godard, Darcy et al., 1990) et de rat (Godard, Darcy et al., 1990) ou dans le lait et les sécrétions intestinales de souris (Chardès, Bourguin et al., 1990). Chez l'homme, les IgA spécifiques sont détectées très précocément lors de l'infection et elles disparaissent en 3 à 9 mois (Seguela, 1982 ; Partanen, Turunen et al., 1984 ; Huskinson, Thulliez et al., 1990). L'antigène P30 ou SAG1, l'antigène majeur de surface du parasite, est précocément reconnu par les IgA sériques (Darcy, Fourdrinier et al., 1992). Les IgA anti-P30 constituent ainsi de bons marqueurs de la toxoplasmose aiguë et leur recherche est à ce titre, très utile pour le diagnostic d'une toxoplasmose congénitale (Decoster, Darcy et al., 1988b ; Decoster, Slizewicz et al., 1991). De plus, lors de l'infection de souris par voie orale, une réponse IgA mucoale est induite à la fois contre des antigènes de surface (SAG1) et contre des antigènes cytoplasmiques (GRA4) (Chardès, Bourguin et al., 1990 ; Chardès, Velge-Roussel et al., 1993).

2- Immunité cellulaire (Subauste and Remington, 1993)

- Situation d'immunocompétence

La réponse cellulaire constitue le facteur majeur de résistance contre l'infection toxoplasmique. L'importance de la réponse cellulaire T a été mise en évidence pour la première fois par Frenkel (Frenkel, 1967) mais l'implication de nombreux types cellulaires ainsi que de nombreuses cytokines a été récemment démontrée. Des travaux récents indiquent également que l'intensité de la réponse immune développée dans les viscères conduirait le parasite à s'enkyster (Blackwell, Roberts et al., 1993).

Le rôle des **lymphocytes T CD4⁺** dans l'acquisition de la résistance à l'infection par *T. gondii* a été démontrée dans le modèle souris (Araujo, 1991). L'activation des **lymphocytes T helper CD4⁺** par les antigènes cytoplasmiques se traduit par une coopération avec les **lymphocytes B** pour une production accrue d'anticorps. En particulier, les lymphocytes T mésentériques stimulés par des antigènes toxoplasmiques produiraient de l'IL5, de l'IL6 et de l'IFN γ , ces molécules intervenant ensuite dans la différenciation des lymphocytes B (Chardès and Bout, 1993). De plus, dans un modèle murin de réactivation d'une pneumonie à *T. gondii* par le CMV, la diminution du nombre de lymphocytes T CD4⁺ et l'influx de lymphocytes T CD8⁺ suppresseurs précèdent la réactivation du parasite dans les poumons (Pomeroy, Filice

et al., 1992). Des clones lymphocytaires T cytotoxiques CD4⁺ viennent également d'être isolés (Curriel, Krug et al., 1993).

L'effet cytotoxique des **lymphocytes T CD8⁺** vis-à-vis du parasite extracellulaire (Khan, Smith et al., 1988 ; Khan, Smith et al., 1990) ou intracellulaire (Hakim, Gazzinelli et al., 1991 ; Subauste, Koniaris et al., 1991 ; Kasper, Khan et al., 1992 ; Denkers, Sher et al., 1993) ainsi qu'une synergie entre lymphocytes CD4⁺ et CD8⁺ ont été récemment démontrés (Gazzinelli, Hakim et al., 1991 ; Parker, Roberts et al., 1991). La déplétion simultanée en lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ entraîne également la réactivation d'une infection chronique chez la souris (Gazzinelli, Xu et al., 1992). Les deux types cellulaires (lymphocytes T CD8⁺ et lymphocytes T cytolytiques restreints par le CMH de classe II) contrôleraient également la formation des kystes (Brown and McLeod, 1990 ; Parker, Roberts et al., 1991).

Nagasawa et col. ont récemment montré dans un modèle murin que la présence d'une souche peu virulente dans l'organisme pourrait induire chez l'hôte, l'expression en abondance d'une Heat Shock Protein (HSP) de 65 kDa par les cellules péritonéales infectées (Nagasawa, Oka et al., 1992). Cette HSP, exprimée en particulier à la surface des macrophages, serait présentée aux lymphocytes T $\gamma\delta$ et activerait le système immunitaire par l'intermédiaire d'une production accrue d'IFN γ . Cette observation est corrélée à la croissance du nombre de lymphocytes T $\gamma\delta$ dans le sang périphérique des patients atteints de lymphadénopathies toxoplasmiques (de Paoli, Basaglia et al., 1992).

Les parasites sont capables de pénétrer activement dans les **macrophages**, comme dans toute autre cellule. Ils s'y multiplient au sein d'une vacuole parasitophore et ils sont capables de résister à la destruction par les macrophages en inhibant la fusion phagosome-lysosome (Sibley, Weidner et al., 1985 ; Sibley and Krahenbuhl, 1988 ; Joiner, Fuhrman et al., 1990). Cependant et en parallèle, l'activation des lymphocytes T se traduit par la production d'IFN γ . Cette molécule aurait un effet cytotoxique direct sur le parasite intracellulaire en induisant l'activation de l'enzyme dégradant le tryptophane, acide aminé nécessaire au développement du Toxoplasme (Pfefferkorn, 1984 ; Pfefferkorn, 1987 ; Chang and Pechere, 1989). L'IFN γ , en présence d'un second messager, le TNF α , peut également activer les macrophages dans leur capacité de diminuer la multiplication des tachyzoïtes intracellulaires (Murray, Rubin et al., 1985). Deux mécanismes sont ainsi développés. Un mécanisme oxydatif conduisant à une production d'H₂O₂ a tout d'abord été démontré (Murray, Rubin et al., 1985 ; Hughes, Boik et al., 1989). Mais les mécanismes O₂ indépendants semblent maintenant plus importants pour expliquer la destruction des parasites intracellulaires. Ce processus, inhibé par l'IL10 (Gazzinelli, Oswald et al., 1992), dépend de la synthèse de citrulline et d'intermédiaires nitrogène qui diminuent la concentration en fer dans le Toxoplasme et par voie de conséquence, l'activité de ses enzymes respiratoires (Sibley, Adams et al., 1993).

Le rôle des **cellules NK** (Natural Killer) est par contre plus controversé. Leur activité cytotoxique, sous la dépendance de l'activation par l'IFN γ , pourrait varier selon la phase de la maladie et un contact entre les cellules NK et les parasites pourrait être nécessaire (Hauser, Sharma et al., 1982 ; Hauser and Tsai, 1986). Par contre, Hughes ne montre pas d'activité létale des cellules NK vis-à-vis du parasite (Hughes, Kasper et al., 1988). Les cellules NK exprimant le marqueur NK1.1, productrices d'IFN γ ont cependant été rapportées comme assurant la protection de souris déficientes en β 2 microglobuline, vaccinées avec un mutant atténué du parasite et infestées par une dose létale de tachyzoïtes (Denkers, Gazzinelli et al., 1993). Les cellules **LAK** (Lymphokine Activated Killer cells) activées par l'IL2 seraient quant à elles, cytotoxiques vis-à-vis de cellules infectées par *T. gondii*. (Sharma, Hofflin et al., 1985 ; Subauste and Dawson, 1992).

Les **plaquettes** non immunes, par le biais d'une libération de tromboxane, seraient cytotoxiques pour le parasite (Yong, Chi et al., 1991). Les métabolites relargués par les plaquettes stimulées par *T. gondii* joueraient un rôle dans la réponse inflammatoire observée lors de l'infection (Henderson and Chi, 1992). Les travaux de Ridel et col. ont de plus montré que les plaquettes de rat infectés ou immunisés par les AES, portent un grand nombre d'IgE de surface et qu'elles assurent, par transfert passif au rat "nude", une protection contre une dose létale de parasites (Ridel, Auriault et al., 1988).

De nombreuses **interleukines et cytokines** influencent et régulent cette réponse immunitaire (Beaman, Wong et al., 1992). Le rôle de l'IFN γ dans l'activation des macrophages a déjà été souligné (Suzuki, Orellana et al., 1988 ; Suzuki and Remington, 1990). Il pourrait constituer un des éléments de la première ligne de défense contre le parasite (Dimier and Bout, 1993b). L'IFN γ peut agir en synergie avec de nombreuses drogues utilisées chez l'homme pour le traitement de la toxoplasmose, ainsi qu'avec l'IL1 α et l'IL1 β (Beaman, Wong et al., 1992). Le TNF α (Tumor Necrosis Factor alpha) serait la seconde molécule nécessaire à l'activation des macrophages préactivés par l'IFN γ (Sibley, Adams et al., 1991) : le TNF α serait en fait à la base de la régulation autocrine des macrophages préactivés par l'IFN γ (Sibley, Adams et al., 1991). Il induit une protection significative chez la souris (Johnson, 1992), en synergie avec l'IL1 α et l'IL1 β (Chang, Grau et al., 1990). De plus, il a été montré tout récemment que la coopération entre l'IL1 β et le TNF α réduisait de façon dose-dépendante la réplication du parasite dans les cellules endothéliales en culture (Dimier and Bout, 1993a). Le TNF α réduirait également le nombre de kystes dans le cerveau (Chang, Pechere et al., 1992). Le rôle de l'IL2 chez la souris, est corrélé à l'augmentation de l'activité des cellules NK (Sharma, Hofflin et al., 1985). Son effet protecteur est par contre lié à l'activation des cellules LAK chez le rat (Dannemann, Morris et al., 1989). L'IL10 (Gazzinelli, Oswald et al., 1992) et sans doute d'autres cytokines assureraient une régulation négative de l'activité des macrophages.

- Situation d'immunodéficience

L'étude de la réactivation d'une toxoplasmose chronique, dans le cadre d'une situation d'immunodéficience, a été récemment développée grâce à un modèle de SIDA murin. La réactivation toxoplasmique est obtenue par déplétion simultanée en lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ (Gazzinelli, Xu et al., 1992). Dans le modèle MAIDS (Murine AIDS), une réactivation partielle est obtenue chez des souris en phase chronique de toxoplasmose infectées par le virus LP-BM5. De même, une encéphalite toxoplasmique peut être induite chez la souris chroniquement infectée, par inoculation du MLV (Murine Leukemia Virus) qui induit l'immunodéficience (Watanabe, Suzuki et al., 1993). Les réponses IL4, IL10 et TGFβ induites ainsi que l'inhibition des réponses IL2 et IFNγ seraient les facteurs impliqués dans l'immunosuppression qui est observée (Gazzinelli, Hartley et al., 1992). L'IFNγ serait donc l'un des facteurs prévenant la rupture des kystes et les 3 molécules IL4, IL10 et TGFβ auraient le pouvoir de rétro-inhiber les macrophages activés par l'IFNγ (Sher, Gazzinelli et al., 1992).

Ces travaux soulignent l'importance de l'IFNγ dans le contrôle de l'infection toxoplasmique. Son emploi dans le traitement des patients HIV⁺ atteints d'encéphalite toxoplasmique pourrait être envisagé (Suzuki and Remington, 1993). En effet, son utilisation dans un modèle de souris infectées chroniquement diminue la réponse inflammatoire dans le cerveau (Suzuki and Remington, 1990). De même, l'IFNγ recombinant induirait une résistance accrue des souris déficientes en lymphocytes T contre une infection aiguë (Suzuki, Conley et al., 1990). Tout récemment, les travaux de Gazzinelli et col. ont montré que dans un modèle de souris SCID, le traitement par l'IL12 augmentait la production d'IFNγ par les cellules NK (Gazzinelli, Hieny et al., 1993). Dans ce modèle de souris SCID, l'IL10 et l'IL6 pourraient réguler à la baisse la réponse immune à l'agent pathogène (Hunter, Abrams et al., 1993).

Cependant, tout comme dans les situations d'immunocompétence, la sévérité des signes cliniques de l'encéphalite toxoplasmique serait liée en partie au patrimoine génétique de l'hôte (Suzuki, Joh et al., 1991) mais également à la souche de Toxoplasmes (Suzuki and Remington, 1993).

3- Influence du patrimoine génétique de l'hôte

La résistance du parasite a surtout été étudiée dans le modèle souris. Elle semble régulée par au moins 5 gènes différents. Un de ces gènes est lié au complexe H2 du chromosome 17 (Williams, Grumet et al., 1978) ; un second gène, non cartographié, contrôle également la résistance au virus *Ectromelia* (McLeod, Brown et al., 1993). De même, un mécanisme similaire d'atténuation des souches semble exister chez le rat (Lecomte, Chumpitazi et al., 1992).

La résistance à l'encéphalite toxoplasmique a été récemment étudiée chez la souris : cette résistance serait liée à un profil RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) spécifique du gène codant pour le TNF α et à la présence de microvariants satellites de ce gène (Freund, Sgarlato et al., 1992).

III- STRUCTURE ET BIOLOGIE DU TOXOPLASME

1- Le tachyzoïte (Figure 2)

Le tachyzoïte est la forme proliférative du parasite, observée pendant la phase aiguë de l'infection. Long de 6 à 7 μm et large de 2 à 3 μm , le tachyzoïte présente une extrémité postérieure plus arrondie que l'extrémité antérieure.

Le parasite est entouré d'un **complexe membranaire** de 600 Å d'épaisseur, organisé en trois feuillettes (Vivier and Petitprez, 1969). La membrane externe, le **plasmalemme**, entoure complètement la cellule ; elle est entourée d'un "cell-coat" de glycoprotéines (glycocalix) irrégulier et peu important. Le **complexe membranaire interne** et indissociable semble formé de vésicules aplaties (Vivier and Petitprez, 1969 ; Porchet and Torpier, 1977) et de nombreuses particules ont été détectées à ce niveau par cryodécapage (Porchet and Torpier, 1977).

Sous la membrane externe, au pôle antérieur de la cellule, se situe le **complexe apical** commun à tous les *Apicomplexa*. Ce complexe est constitué d'anneaux polaires, de rhoptries, de granules denses, du conoïde, de micronèmes, de microtubules et d'un micropore (Vivier and Petitprez, 1972 ; Chobotar and Scholtyseck, 1982). Le **conoïde** (figure 3), en forme de tronc de cône, est constitué de structures fibrillaires enroulées en spirale. L'anneau polaire situé à la base du conoïde, sert d'insertion à 22 microtubules longitudinaux et pourrait constituer le centre organisateur de ces microtubules. Un second anneau situé dans la région antérieure du parasite (anneau préconoïdal) constituerait un second centre organisateur (Nichols and Chiappino, 1987). Les tubulines α et β (50-55 kDa) qui co-polymérisent pour former les microtubules seraient ainsi impliquées, comme dans toute cellule eucaryote, dans la formation de l'architecture cellulaire, la motilité, le transport intracellulaire, la sécrétion et la division cellulaire (Schwartzman, Krug et al., 1985 ; Nagel and Boothroyd, 1988 ; Foussard, Gallois et al., 1990).

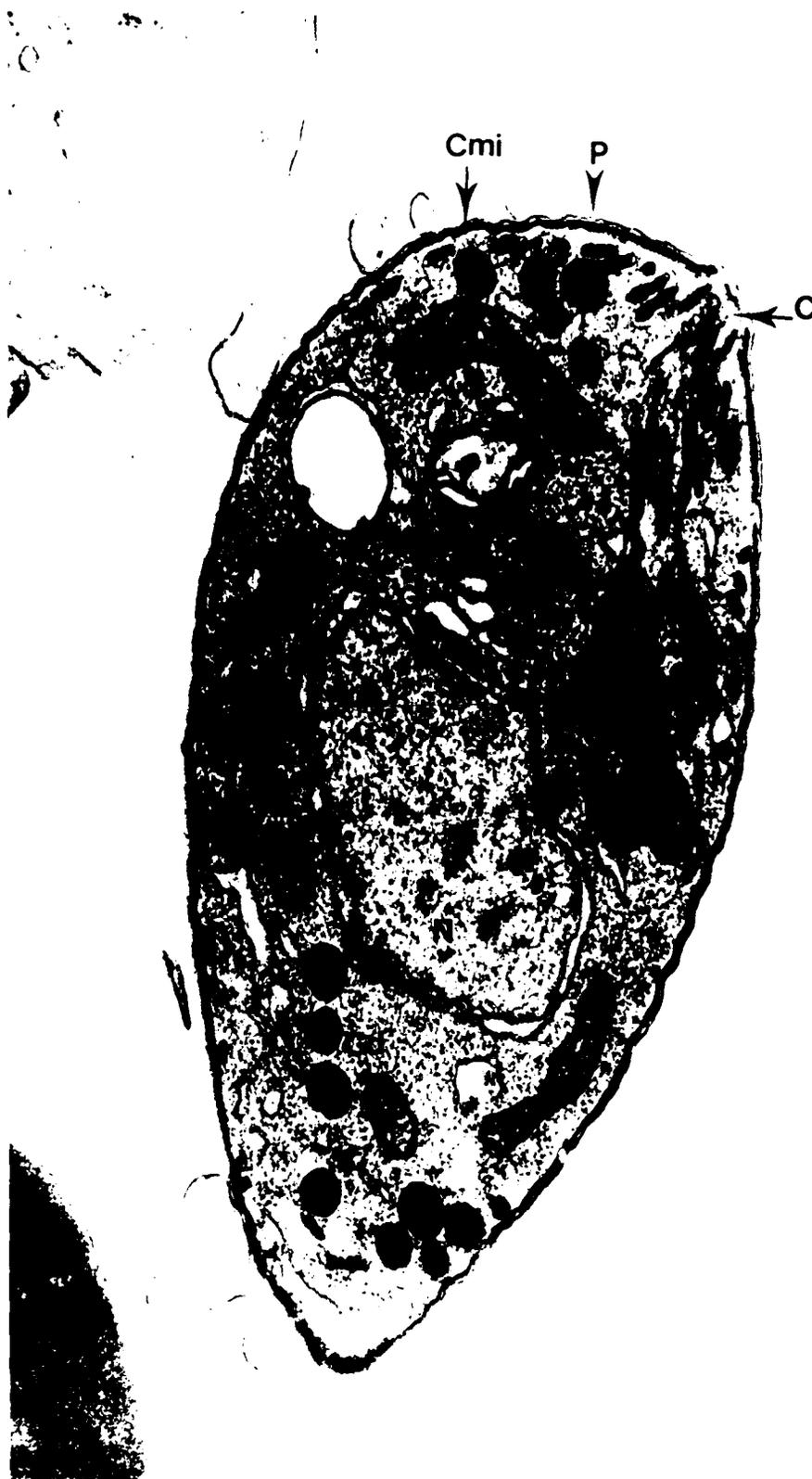


Figure 2 : Ultrastructure du stade Tachyzoïte libre (souche RH) de *Toxoplasma gondii* . Coupe longitudinale montrant les principales structures (d'après Vivier et Petitprez. 1972)

Le complexe membranaire qui entoure le tachyzoïte est composé d'un plasmalemme (P) et d'un complexe membranaire interne (Cmi). Le conoïde (C) et la mitochondrie (M) sont visibles dans la partie antérieure du parasite. L'appareil de Golgi (G) se trouve au contact du noyau (N). Les rhoptries (R) sont d'aspect glandulaire. Les organites denses aux électrons correspondent aux granules denses (Gd). (x 35.000)

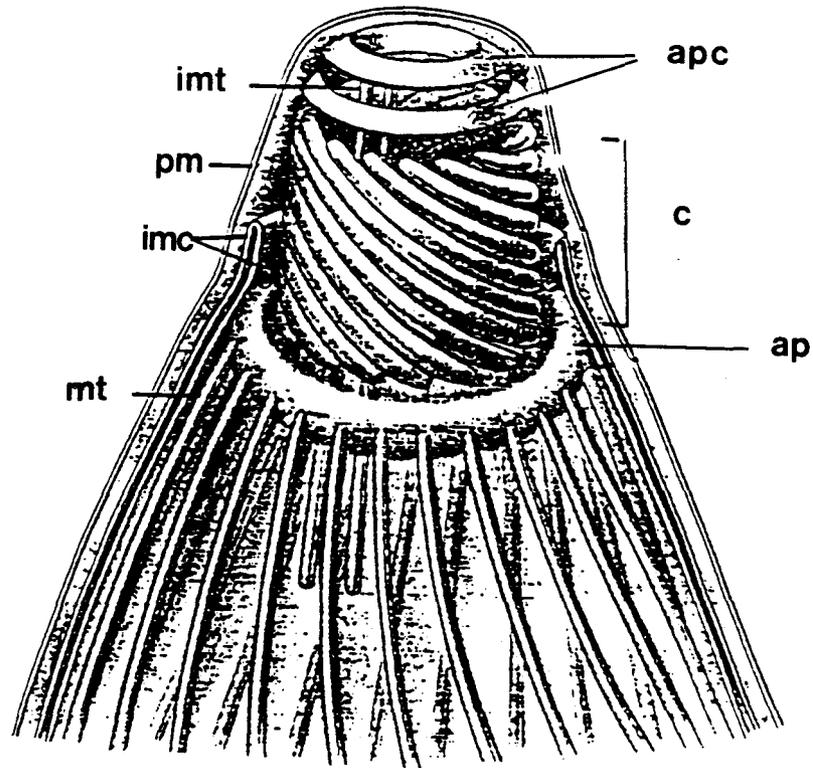


Figure 3 : Diagramme de la partie antérieure du tachyzoïte (d'après Nichols et Chiappino. 1987)

ap : anneau polaire ; **apc** : anneaux pré-conoïdaux ; **c** : conoïde ; **imc** : complexe membranaire interne ; **imt** : microtubule interne ; **mt** : microtubule ; **pm** : plasmalemme

Bien que ne possédant ni flagelle ni cil, le *Toxoplasme* comme tous les Protozoaires, est très **mobile**. Il peut se mouvoir avec une vitesse égale à 400 fois sa longueur par seconde et maintenir son cap sur 200 μm (Long and Speer, 1977). Aucun signal de tropisme qui guiderait le parasite vers sa destination n'a encore été décrit. Un gradient de protons de part et d'autre de la membrane du parasite est nécessaire pour initier la motilité (Endo, Tokuda et al., 1987). De nombreux types de mouvement ont été décrits et en particulier, un mouvement de glissade ("gliding") selon l'axe antéro-postérieur de la cellule (1 à 10 $\mu\text{m/s}$) (King, 1988). La **dynéine** pourrait être impliquée dans les phénomènes de motilité (Nichols and Chiappino, 1987). L'inhibition des mouvements du parasite par les cytochalasines B ou D semblerait indiquer que les microfilaments et non les microtubules sont requis pour le mouvement (Yasuda, Yagita et al., 1988). Des molécules d'**actine** monomérique ou polymérisée en de très courts filaments (Yasuda, Yagita et al., 1988) ainsi que des molécules de **myosine** (Schwartzman and Pfefferkorn, 1983) sont détectées dans la partie antérieure du parasite, sous la membrane interne et au niveau de l'anneau polaire (Taylor, Evans et al., 1990). Elles seraient responsables des mouvements du parasite et seraient impliquées dans les phénomènes d'invasion cellulaire.

Bien que décrites depuis de nombreuses années, les **organelles de sécrétion** du *Toxoplasme* ont été isolées pour la première fois en 1991 par Leriche et col. (Leriche and Dubremetz, 1991).

Les **rhoptries**, au nombre d'une dizaine, sont des organites denses aux électrons en forme de massue, de 4 μm de long environ et situés dans la partie antérieure du parasite (Vivier and Petitprez, 1972). Elles se poursuivent par un long pédoncule en direction de l'apex. Elles sont considérées comme des "glandes sécrétrices" qui vident leur contenu lors de l'invasion du parasite dans la cellule-hôte mais gardent leur forme et leur intégrité membranaire (Joiner, 1991). Les **granules denses** sont quant à eux, des organites cytoplasmiques de 0.2 μm de diamètre situés de part et d'autre du noyau. Ils sont constitués d'un contenu homogène très dense aux électrons. Les **micronèmes** sont d'autres organites denses aux électrons, plus petits que les granules denses, en forme de bâtonnets et localisés dans la partie antérieure des tachyzoïtes.

D'autres **organites classiques** sont détectés dans les tachyzoïtes : outre le noyau (1 à 2 μm de diamètre) dans la partie postérieure du parasite, une mitochondrie unique et ramifiée, un appareil de Golgi au contact du noyau, un réticulum endoplasmique et de nombreux ribosomes sont présents dans la cellule. Des grains d'amylopectine, entourés d'aucune membrane, sont également visibles dans la partie postérieure (Vivier and Petitprez, 1972).

2- Invasion de la cellule-hôte et multiplication du tachyzoïte

- contact avec la cellule-hôte

Le Toxoplasme est capable potentiellement d'envahir tous les types cellulaires. Seuls les protoplastes de plantes dont la viscosité membranaire est plus faible, sont résistants à l'infection (Werk and Fischer, 1982). La rencontre du parasite avec sa cellule-hôte est favorisée par les mouvements de glissement et par les changements de forme provoqués par le cytosquelette parasitaire (Chiappino, Nichols et al., 1984). Le contact avec la cellule-hôte peut mettre en jeu une partie quelconque de la surface du parasite mais il se redresse alors pour présenter sa partie apicale (Aikawa, Komata et al., 1977) par des mouvements de "twist and rock" (Rondanelli, Senaldi et al., 1986).

Des **récepteurs parasitaires** reconnaissant des molécules de surface communes à tous les types cellulaires et à de nombreuses espèces pourraient donc être impliqués. La laminine distribuée de façon uniforme à la surface du Toxoplasme participerait par exemple à la liaison des tachyzoïtes sur les fibroblastes, en servant de pont entre le parasite et l'intégrine $\alpha 6\beta 1$ de la cellule cible (Furtado, Slowik et al., 1992). Par contre, les lectines et les récepteurs aux lectines ne semblent pas impliqués (Werk, 1985).

La membrane de la cellule-hôte ne présenterait pas la même attraction pour le parasite selon la phase du cycle cellulaire dans laquelle elle se trouve ; la phase de synthèse serait ainsi un moment privilégié pour l'infestation (Dvorak and Crane, 1981). La motilité et l'invasion seraient de plus favorisées à la fois par un pH alcalin dans le milieu extérieur (Endo and Yagita, 1990) et par l'âge de la cellule (Werk, 1985).

- Invasion de la cellule-hôte

Le taux de pénétration intracellulaire du parasite serait lié à la concentration parasitaire inoculée, de façon dose-dépendante jusqu'à obtention d'un palier (Sadak, Frontier et al., 1986). L'invasion est un phénomène rapide (10 à 30 secondes alors que la phagocytose nécessite par exemple 120 secondes environ ; Werk, 1985). Ce phénomène requiert l'énergie du parasite (Werk and Bommer, 1980) et dépend de sa motilité. Les mouvements en vrille du Toxoplasme provoquent des déformations du parasite mais sans redistribution de l'actine et des microfilaments sous-jacents au site de pénétration (Sibley et al., en préparation). La protrusion du conoïde entraîne l'invagination de la membrane plasmique en avant du parasite et la formation d'une ouverture de 1.5 μm de diamètre environ (Hirai, Hirato et al., 1966 ; Bommer, Hofling et al., 1968 ; Bommer, Heunert et al., 1969). Le feuillet interne du système membranaire se condense au point de pénétration et forme une **jonction mobile** qui coulisse vers le pôle postérieur du parasite. Lorsque cette jonction a atteint le pôle postérieur du parasite, la membrane entourant le parasite se pince, se détache du plasmalemme et isole le parasite du cytoplasme de la cellule-hôte, dans une vacuole parasitophore qui résiste à la fusion avec les lysosomes et ne s'acidifie pas (Jones and Hirsch, 1972; Jones, Yeh et al., 1972; Johnson, McDonald et al., 1979). Cette jonction mobile servirait également de barrière

à la diffusion des molécules de la membrane de la cellule-hôte dans la membrane de la vacuole (Dubremetz and Schwartzman, 1993).

La **vacuole parasitophore**, quelques minutes après l'invasion, est rapidement entourée d'une couche de mitochondries et de réticulum endoplasmique du cytoplasme cellulaire. Ces organelles pourraient apporter l'énergie nécessaire à la multiplication du parasite ou prévenir la fusion de la vacuole parasitophore avec les lysosomes (Jones and Hirsch, 1972; Jones, Yeh et al., 1972; Johnson, McDonald et al., 1979).

La phospholipase A2, Ca²⁺-dépendante, qui clive la lécithine des membranes en lysolécithines, formerait des pores dans la membrane de la cellule-hôte et constituerait donc l'un des facteurs importants de la pénétration intracellulaire des parasites (Saffer, Long et al., 1989; Saffer and Schwartzman, 1991). La production d'écicosanoïdes qui dérivent du métabolisme de l'acide arachidonique serait également impliquée dans ce processus (Thardin, M'Rini et al., 1993).

- *Modification de la vacuole parasitophore*

La vacuole parasitophore est donc un compartiment qui se forme lors de l'invasion du parasite dans la cellule et qui dérive initialement de la membrane de cette cellule. A l'interface entre le Toxoplasme et la cellule parasitée, elle jouerait un rôle fondamental dans les échanges métaboliques entre les deux protagonistes. Résistant à la fusion avec les lysosomes et les compartiments endocytiques de la cellule-hôte, elle assure également l'isolement et la protection du parasite. Les mécanismes cellulaires qui empêchent la fusion de la vacuole parasitophore avec les lysosomes nécessitent que le parasite soit vivant lors de son entrée dans la cellule (Joiner, Fuhrman et al., 1990). Ces mécanismes qui assurent l'incompétence de fusion de la vacuole sont irréversibles mais ne semblent pas reposer sur la sécrétion dans la vacuole d'un inhibiteur soluble (Joiner, Fuhrman et al., 1990). Au contraire, ces mécanismes reposeraient sur l'exclusion de protéines de la membrane de la cellule-hôte, molécules responsables de la formation d'un "complexe de fusion" encore inconnu. Les GTP-binding protéines de la famille **rab** pourraient en faire partie (Joiner, 1993). De même, l'exclusion de la pompe à protons (ATPase H⁺) caractéristique des compartiments endocytiques (endosomes et lysosomes) pourrait expliquer cette inhibition de fusion et d'acidification (Sibley and Boothroyd, 1992a). Les lipides sécrétés (cholestérol et phospholipides essentiellement) à partir des rhoptries lors de l'invasion, en altérant la composition de la membrane de la vacuole parasitophore, seraient en partie responsables de l'inhibition de fusion de cette vacuole avec les autres compartiments cellulaires (Foussard, Leriche et al., 1991).

La vacuole parasitophore se caractérise également par la présence de structures membranaires intravacuolaires qui constituent un réseau ("network") et assurent la continuité entre la membrane du parasite et la membrane de la vacuole parasitophore. Ce réseau peut être mis en évidence 5 minutes seulement après l'invasion du parasite (Sibley, Krahenbuhl et al., 1986 ; Sibley and Krahenbuhl, 1988). Les molécules sécrétées par le parasite lors et juste après l'invasion viendraient contribuer à la formation et à la stabilisation de ce réseau. Ces

molécules semblent surtout provenir des granules denses (Charif, Darcy et al., 1990 ; Leriche and Dubremetz, 1990 ; Achbarou, Mercereau-Puijalon et al., 1991b) mais l'implication des molécules de micronèmes est également avancée (Achbarou, Mercereau-Puijalon et al., 1991a). Le rôle des protéines GRA au sein de la vacuole parasitophore n'est pas connu. Plusieurs hypothèses sont émises. Elles pourraient par exemple jouer un rôle important pour l'acquisition de nutriments à partir de la cellule-hôte, dans le transport et l'exportation de composés parasites vers le cytoplasme de cette cellule, dans les modifications enzymatiques des constituants de cette cellule ; elles pourraient également entrer dans la composition de la structure de la paroi kystique (Joiner and Dubremetz, 1993).

- *Multiplication des tachyzoïtes* (Fortier and Dubremetz, 1993)

La multiplication extracellulaire du parasite n'a jamais été démontrée (Jones, Yeh et al., 1972). Dès l'entrée du Toxoplasme dans la cellule, celui-ci perd toute motilité et un cycle de division commence (Bommer, Hofling et al., 1968).

Les tachyzoïtes se multiplient par endodyogénie : par fission binaire, deux cellules filles se forment à l'intérieur de chaque parasite (figure 4). Le cycle de division dure de 5 à 10 heures selon la souche parasitaire (Jones, Yeh et al., 1972). Au cours de ce cycle, le noyau s'étrangle sans qu'il y ait rupture de l'enveloppe nucléaire. Celle-ci envoie alors une lame qui s'étend à l'intérieur du cytoplasme cellulaire en enserrant une certaine quantité de cytoplasme maternel autour des noyaux fils. La synthèse de l'ADN est accompagnée d'une production d'ATPase (Adénosine Tri-Phosphatase) (Jones, Yeh et al., 1972). Chaque duplication parasitaire s'accompagne également d'une duplication des rhoptries.

- *Sortie de la cellule-hôte* (Fortier and Dubremetz, 1993)

La reprise des mouvements du parasite lui permet de traverser successivement la membrane de la vacuole parasitophore, le cytoplasme puis le plasmalemme de la cellule infectée. De cette façon, une cellule-hôte peut libérer en deux jours, 64 à 256 tachyzoïtes disposés en rosette dans la vacuole (Jones, Yeh et al., 1972). Les lésions provoquées au niveau de la membrane de la cellule-hôte sont alors irrémédiables.

Cas particulier des cellules phagocytaires

Dans le cas des cellules phagocytaires, le processus d'invasion semble différent selon que le parasite est opsonisé ou non par des anticorps spécifiques (Sibley, Weidner et al., 1985).



Figure 4 : Vue d'ensemble d'une cellule-mère (**M**) portant en son sein, deux endozoïtes (**E1** et **E2**) (d'après Vivier et Petitprez. 1972)

Quelques rhoptries (**R**), un granule dense (**gd**) et des vésicules golgiennes (**G**) issues de la paroi nucléaire (**N**) sont observées dans l'endozoïte E1. (x 35.000)

Opsonisation préalable du parasite

La route d'entrée du parasite dans la cellule-hôte serait en effet modifiée par l'opsonisation (Joiner, 1993) : en se liant au Fc-Récepteur des cellules, les parasites seraient inclus dans une vacuole altérée, dont l'espace entre la membrane de la vacuole et le parasite est réduit (Nichols and O'Connor, 1981). Cette vacuole altérée serait responsable de l'initiation du processus de fusion avec les lysosomes (Sibley, 1993). Dans ce cas, le processus d'entrée dans la cellule est plus lent, ne nécessite pas l'orientation préalable du Toxoplasme par rapport à la cellule-hôte et la membrane de la vacuole parasitophore n'exclut pas les marqueurs de la cellule-hôte (Joiner, 1993).

Sans opsonisation préalable du parasite

Au contraire, lorsque la densité des Fc-récepteurs à la surface de la cellule-hôte est plus faible, ceux-ci pourront être rapidement éliminés de la vacuole parasitophore qui apparaît alors plus large. La vacuole contient dans ce cas les structures tubulaires classiques d'un réseau. La cascade des processus de fusion avec les lysosomes ne sera pas initiée (Sibley, 1993). L'ATPase-Mg²⁺ dépendante ainsi que la 5'-Nucléotidase de la membrane de la cellule-hôte ne sont pas intériorisées dans la membrane de la vacuole (de Carvalho and de Souza, 1989).

3- Kystes et bradyzoïtes (Fortier and Dubremetz, 1993)

- *Kystes* (figure 5)

Les kystes constituent avec les oocystes, les formes de résistance du parasite : ils restent viables après une exposition de 68 jours à 4°C mais sont sensibles à la congélation et à la salaison ou à une température de 67°C pendant 3 minutes.

Les kystes, de 5 à 50 µm de diamètre et habituellement sphériques, se forment dans les tissus musculaires et nerveux, à partir du cytoplasme de la cellule-hôte. Ils ne sont jamais extracellulaires et ne sont entourés d'aucune réaction inflammatoire (Ferguson and Hutchison, 1987). De la même façon qu'elles entourent la vacuole parasitophore, les mitochondries de la cellule infectée restent en étroite association avec la paroi kystique (Lindsay, Mitscher et al., 1993). La membrane des kystes est doublée d'un matériel granulaire condensé en couches homogènes. Ils peuvent renfermer plusieurs centaines de bradyzoïtes.

Ils apparaissent dans le cerveau environ deux semaines après l'infection et sont maintenus pendant plusieurs semaines. Leur taille continue d'augmenter jusque la quatorzième ou la quinzième semaine après l'infection. Le maintien des kystes intracellulaires sans dégénérescence des bradyzoïtes qu'ils contiennent serait assuré par un passage de nutriments provenant de la cellule-hôte au travers de la paroi kystique. Ce maintien des kystes dans le cerveau serait également influencé par la souche de Toxoplasmes et des facteurs génétiques liés à l'hôte (Ferguson, Hutchison et al., 1989). Les kystes sont caractéristiques de la phase chronique de l'infection : en relarguant de faibles quantités d'antigènes dans

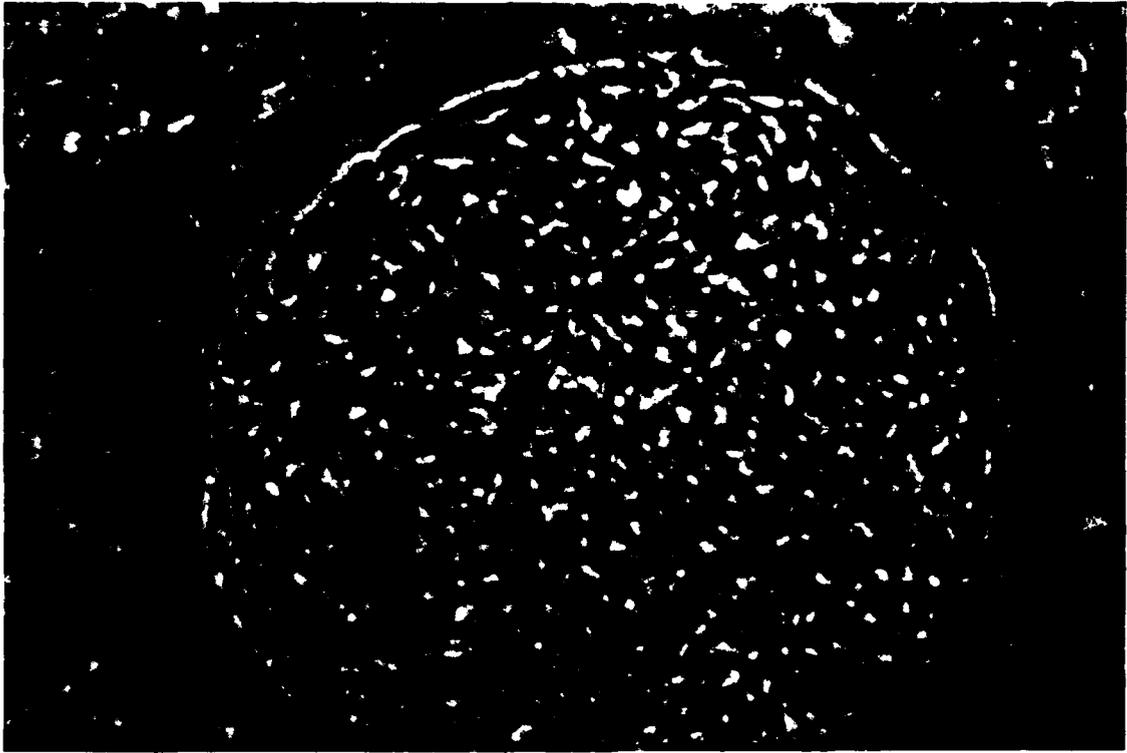


Figure 5 : Observation d'un kyste intracérébral en microscopie optique (x 1000) (d'après F. Derouin)

l'organisme, ils permettraient le maintien de l'immunité protectrice (Huldt, 1971) ; la rupture occasionnelle de l'un de ces kystes n'entraîne pas de conséquences graves chez l'individu immunocompétent (Ferguson, Hutchison et al., 1989).

- *Bradyzoïtes*

Ces formes parasitaires dont le métabolisme est ralenti ont une structure très proche de celle des tachyzoïtes. Leur dimension est cependant plus petite, le noyau se trouve dans une position plus postérieure et les micronèmes ainsi que les grains d'amylopectine sont plus abondants. Les grains d'amylopectine pourraient fournir l'énergie nécessaire au parasite pendant sa phase de latence (McLeod, Mack et al., 1991).

Les bradyzoïtes contenus dans de "vieux" kystes (présents depuis plus de 4 semaines) subiraient une différenciation puis une dégénérescence progressive qui se traduit par la perte des membranes internes du parasite (Golgi et du réticulum endoplasmique, des micronèmes et du plasmalemme). Le contenu cytoplasmique serait ainsi peu à peu déversé dans la matrice kystique : le contenu des micronèmes pourrait par exemple être constitué d'enzymes dont le rôle serait de dissoudre la paroi kystique (Pavesio, Chiappino et al., 1992).

- *Conversion tachyzoïtes-bradyzoïtes*

Peu de choses sont encore connues concernant les facteurs qui déterminent le passage du stade prolifératif au stade enkysté et réciproquement. L'intérêt de cette étude est renforcé depuis l'émergence du SIDA et du nombre croissant d'encéphalites toxoplasmiques.

L'observation des marqueurs spécifiques des stades tachyzoïte et bradyzoïte (Bohne, Heesemann et al., 1993b) a permis récemment de montrer que la différenciation des bradyzoïtes en tachyzoïtes n'est pas synchrone au sein d'une population clonée de parasites (Soete, Fortier et al., 1993) ou au sein d'une population homogène de vacuoles parasitophores (Bohne, Heesemann et al., 1993a). La présence de facteurs immunologiques ne semble pas nécessaire pour induire la reprise du stade prolifératif (Soete, Fortier et al., 1993) ou pour induire la formation de kystes *in vitro* (Dardé, Bouteille et al., 1989). Le passage de la forme bradyzoïte à la forme tachyzoïte semble cependant plus rapide que le passage de la forme tachyzoïte à la forme bradyzoïte (48 heures versus 72 heures) (Lindsay, Dubey et al., 1991 ; Soete, Fortier et al., 1993).

4- Biochimie du Toxoplasme

Les voies métaboliques de ce parasite ne sont pas encore connues. Cependant, depuis quelques années, les recherches se sont intensifiées en ce qui concerne essentiellement les processus de glycosylation développés par ce Protozoaire. L'étude de certaines de ses enzymes a été appliquée à la mise au point de nouveaux moyens de diagnostic de la maladie ou de nouvelles drogues.

- *Glycosylation*

La présence (en faible nombre) de molécules glycosylées à la surface du tachyzoïte a tout d'abord été mise en évidence par la fixation de lectines (Mauras, Dodeur et al., 1980). Des sites de liaison aux lectines ont également été détectés sur la paroi des kystes (Sethi, Rahman et al., 1977). Certaines des molécules glycosylées (Darcy, Charif et al., 1990 ; Achbarou, Mercereau-Puijalon et al., 1991b) ont depuis été caractérisées (de Carvalho, Souto-Padron et al., 1991 ; Mercier, Lecordier et al., 1993).

Des études récentes ont mis en évidence que trois processus de glycosylation sont possibles chez le Toxoplasme. Au niveau du réticulum endoplasmique, les résidus Asparagine des polypeptides peuvent subir une **N-glycosylation** (Odenthal-Schnittler, Tomavo et al., 1993). Les résidus Sérine et Thréonine peuvent quant à eux être **O-glycosylés** (Schwarz and Tomavo, 1993). Une structure particulière d'insertion des protéines de surface dans la membrane du parasite a également été décrite : l'addition sur les protéines d'un glycolipide précurseur de cette structure d'ancrage (groupement Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol ou **GPI**) a lieu au niveau du réticulum endoplasmique. Ce processus très rapide (quelques secondes à quelques minutes) fait intervenir le déplacement simultané de l'extrémité C-terminale du polypeptide initial (Tomavo, Dubremetz et al., 1992a).

- *Biochimie des lipides*

La composition lipidique des membranes du parasite montre un rapport Cholestérol/Phospholipides très faible, la présence de beaucoup d'acides gras insaturés et de phosphatidylcholine mais de peu de sphingomyéline. Ces résultats indiqueraient une grande fluidité membranaire en relation avec l'adaptabilité du parasite aux différents types cellulaires (Gallois, Foussard et al., 1988). Le cholestérol présent dans les membranes parasitaires pourrait être apporté par les LDL qui sont incorporées en plus grande quantité par la cellule quand celle-ci est infectée.

- *Enzymes*

Quelques enzymes du parasite sont maintenant caractérisées. Spécifiques du Toxoplasme, elles peuvent être la cible d'agents chimiothérapeutiques. C'est le cas par exemple de la **DHFR** (DiHydroFolate Réductase). Cette enzyme bifonctionnelle (elle contient aussi une activité Thymidylate Kinase) est nécessaire au parasite pour réduire les folates qu'il ne peut pas utiliser (Kovacs, Allegra et al., 1990). C'est le cas également d'une enzyme de la chaîne de la glycolyse, la **phosphofructokinase** dépendante de pyro-phosphate ; cette enzyme est remplacée chez les Mammifères par une phosphofructokinase dépendante d'ATP (Peng and Mansour, 1992).

Deux enzymes qui pourraient contribuer à la survie du parasite dans la vacuole parasitophore et à la détoxification des intermédiaires oxygène qui y sont produits ont encore été mises en évidence : la superoxyde-dismutase (**SOD**) et la **catalase** seraient impliquées dans le maintien du pH neutre de la vacuole (Sibley, Lawson et al., 1986).

Le **métabolisme des purines** a fait l'objet de très nombreuses études. De nombreuses enzymes de ce métabolisme ont été décrites (Pfefferkorn, 1990) et en particulier, la Nucléoside Triphosphatase (NTPase ou ATPase spécifique des nucléosides tri-phosphates) . Comme tous les Protozoaires, le Toxoplasme ne peut pas synthétiser ses purines *de novo* (Schwartzman and Pfefferkorn, 1982 ; Krug, Marr et al., 1989). L'ATP prélevé dans son environnement serait ainsi dégradé en adénosine avant son utilisation par une ATPase abondante et unique (Pfefferkorn, 1990). Elle représente environ 8% des protéines totales du tachyzoïte. C'est une enzyme constituée de 4 sous-unités de 63 kDa, présente dans le cytoplasme du parasite ou associée par des interactions faibles avec toutes les membranes (Asai, O'Sullivan et al., 1983 ; Asai and Kim, 1987 ; Asai and Suzuki, 1990). Le métabolisme des pyrimidines vient également d'être exploré (Iltzsch, 1993).

IV- GENETIQUE DU TOXOPLASME

1- Caryotype et ADN

Le Toxoplasme présente un cycle de vie complexe qui comprend des stades parasitaires diploïdes et haploïdes (stades invasifs). Une mitose et une méiose qui suivent les lois de la génétique classique ont lieu lors de la sporulation des oocystes. Au cours de la méiose, des marqueurs non liés ségrègent de façon indépendante (Pfefferkorn and Pfefferkorn, 1980). La gamétogénèse n'a lieu que dans les entérocytes de l'intestin du chat. Au cours de la mitose, le Toxoplasme se réplique rapidement comme toute cellule haploïde mais les chromosomes ne se condensent pas en métaphase et la membrane nucléaire reste intacte (Pfefferkorn, 1990 ; Sibley and Boothroyd, 1992).

Le génome est constitué d'au moins **11 chromosomes** (Sibley and Boothroyd, 1992b) dont 9 sont séparables par électrophorèse en champ pulsé (Candolfi, Arveiller et al., 1988 ; Sibley and Boothroyd, 1992b). Leur taille, de 2 à plus de 10 Mb est stable par propagation mitotique et le polymorphisme entre les souches reste faible (Sibley, Pfefferkorn et al., 1993).

L'établissement de la carte génétique des 11 chromosomes des souches de Toxoplasmes les plus courantes est maintenant en cours de réalisation (Sibley, résultats préliminaires). Elle fait suite aux études de cartographie des chromosomes (Sibley and Boothroyd, 1992b) ou de l'ADN génomique préalablement digéré par des enzymes de restriction (Cristina, Oury et al., 1991 ; Boothroyd and Sibley, 1993).

Une activité ADN polymérase qui présente certaines propriétés physico-chimiques communes avec l'ADN polymérase α des Mammifères vient d'être tout récemment mise en évidence (Makioka, Stavros et al., 1993).

La quantité d'ADN par tachyzoïte haploïde, estimée par cytofluorimétrie, serait de 164.10^{-15} g (Cornelissen, Overdulve et al., 1984) ou 80 Mb environ (Sibley, Pfefferkorn et al., 1993). La purification de l'ADN génomique de tachyzoïte par ultracentrifugation en gradient de densité isopycnique de CsCl a montré que le GC% est de 50.4% et qu'il n'y a pas de méthylation significative de l'ADN (Johnson, Dubey et al., 1986).

De petits ADN circulaires (12 et 24 μ m) qui pourraient correspondre aux ADN mitochondriaux ont été isolés par Borst et col. (Borst, Overdulve et al., 1984). De plus, des séquences répétées et homologues à certains gènes mitochondriaux (cytochrome oxydase et apocytochrome b) ont été mises en évidence dans l'ADN génomique. Ces séquences pourraient résulter d'un transfert de matériel génétique entre les différents compartiments de la cellule (Ossorio, Sibley et al., 1991).

2- Nomenclature des gènes clonés

De nombreux gènes du Toxoplasme sont maintenant clonés et séquencés. Ils codent pour des molécules de surface du parasite, des molécules de sécrétion ou pour des enzymes et protéines de "ménage". Sibley et col. ont proposé une nomenclature inspirée de celle utilisée pour les gènes de la levure, afin de regrouper et de classer ces différents gènes (Sibley, Pfefferkorn et al., 1991). Les gènes *SAG* codent pour les antigènes de surface, les gènes *GRA* codent pour les molécules de granules denses, les gènes *ROP* et *MIC* correspondent aux protéines de rhoptries et de micronèmes (tableau I).

Les études de Johnson et col. (Johnson, 1990a) ont montré que les dinucléotides AT, TA et GG sont sous-représentés dans l'espèce *Toxoplasma*, tout comme dans les espèces *Babesia*, *Theileria* (piroplasmes) et *Eimeria* (coccidie) (Ellis, Griffin et al., 1993) et qu'il existe un biais dans le codon usage : la troisième base des codons est souvent constituée d'un G ou d'un C, du moins dans les gènes très exprimés (P30 ou *SAG1*, *NTPase*). Ces deux caractéristiques permettent de distinguer l'espèce *Toxoplasma* de celle de *Plasmodium*. L'environnement du codon d'initiation de la traduction des gènes toxoplasmiques semble être conforme aux critères définis pour les eucaryotes supérieurs, Purine en -3 et G en +4 (Kozak, 1984).

TABLEAU I**Nomenclature des gènes du Toxoplasme (d'après Sibley, Pfefferkorn et al. 91)**

<u>GENE</u>	<u>CHROMOSOME</u>	<u>PROTEINE</u>	<u>REF. BIBLIO</u>
MOLECULES DE SURFACE (SAG)			
SAG1	VIII	SAG1=P30	(Burg, Perelman et al., 1988)
SAG2	VIII	SAG2=P22	(Prince, Auer et al., 1990)
SAG3	?	SAG3=GP43	(Cesbron-Delauw et al., in preparation)
SAG4	?	SAG4=P35	
MOLECULES DE SECRETION			
<i>Gènes de granules denses</i>			
GRA1	?	GRA1=P23	(Cesbron-Delauw et al., 1989)
GRA2	?	GRA2=P28	(Parmley, Sgarlato et al., 1993) (Mercier, Lecordier et al., 1993)
GRA3	?	GRA3 (30 kDa)	(Achbarou et al., 1991)
GRA4	?	GRA4 (40 kDa)	(Mévelec, Chardès et al., 1992)
GRA5	?	GRA5=P21	(Lecordier, Mercier et al., 1993)
GRA6	?	GRA6=P32	(Lecordier et al., in preparation)
<i>Gènes de rhoptries</i>			
ROP1	IX	ROP1	(Ossorio et al., 1992)
ROP2	?	ROP2=P54	(Saavedra, De Meuter et al., 1991)
AUTRES PROTEINES			
TUB1	IX	α -Tubuline	(Nagel and Boothroyd, 1988)
TUB2	IX	β -Tubuline	(Nagel and Boothroyd, 1988)
ACT	I	Actine	(Doborowsky et col., comm. pers.)
DHFR/TS	?	DHFR/TSase	(Roos, 1993)
NTP1	V	NTPase	(Johnson, Illana et al., 1989)
ARN 5S	?		(Guay, Huot et al., 1992)
ARN 16S	?		(Gagnon, Levesque et al., 1993)
TGR1E, TGR1A	?	?	(Cristina, Liaud et al., 1991)
TGR2, TGR4			

2- L'ARN

Peu d'études ont été réalisées jusqu'à ce jour pour caractériser l'ARN du Toxoplasme. Des travaux déjà anciens ont montré que les tachyzoïtes possèdent les enzymes nécessaires à la synthèse de l'ARN et en particulier, l'uridine phosphorylase (Pfefferkorn and Pfefferkorn, 1977).

Certains des gènes contiennent des introns (*TUB1*, *TUB2*, *DHFR*, *GRA2*) dont les sites donneur et accepteur d'épissage semblent suivre le consensus AG/gt.....cag/GX (Nagel and Boothroyd, 1988 ; Mercier, Lecordier et al., 1993 ; Roos, 1993). Cette caractéristique placerait le Toxoplasme plus haut dans l'échelle de l'évolution que les kinétoplastides (Trypanosomes, Leishmanies). L'épissage alternatif n'a pas encore été mis en évidence.

La maturation des transcrits primaires peut être réalisée *in vitro*, à l'aide d'un extrait nucléaire de cellules Hela (Nagel and Boothroyd, 1988). De même, la synthèse des protéines dans un système de traduction *in vitro* a pu être mise en évidence à partir d'ARN polyA⁺ extrait de la souche RH (Prince, Koven et al., 1985) et en système de lysat de réticulocytes de lapin (Johnson, McDonald et al., 1986). Ces résultats sembleraient indiquer que les principaux signaux gouvernant la traduction des ARN du Toxoplasme seraient identiques à ceux mis en oeuvre par les cellules eucaryotes supérieures.

ARN ribosomiques

L'analyse et la comparaison des séquences d'ARNr a permis de classer phylogénétiquement les Protistes (Johnson and Baverstock, 1989), de séparer les espèces *Hammondia* et *Toxoplasma* (Johnson, Illana et al., 1987), de regrouper les espèces *Sarcocystis* et *Toxoplasma* au sein d'un même phylum (Johnson and Baverstock, 1989) mais de les séparer de l'espèce *Plasmodium*.

Trois bandes majeures de 28S, 18S et 14S ont été isolées par ultracentrifugation des ARN de tachyzoïtes (Johnson, McDonald et al., 1986). Le poids moléculaire des sous-unités de 28S et 18S correspond au poids moléculaire des ARN ribosomiques d'autres Protozoaires parasites tels que *Plasmodium* ou *Trypanosoma* (Johnson, McDonald et al., 1986).

Comme pour tous les autres organismes eucaryotes, l'ARN ribosomique est transcrit par deux ARN polymérases. Le gène de L'ARN 5S (123 nucléotides), transcrit par l'ARN polymérase III, est localisé ailleurs dans le génome toxoplasmique qu'à l'intérieur de l'unité de transcription de 7.5 Kb. Cette unité de transcription codant pour l'ARNr 26S, 18S et 5.8S et répétée 110 fois en tandem, est transcrite par l'ARN polymérase I (Guay, Huot et al., 1992).

3- Polymorphisme génétique

En 1957, Jacobs et Lunde montrent que plusieurs isolats de *Toxoplasmes* issus de Mammifères présentent une virulence différente dans les modèles animaux (Jacobs and Lunde, 1957). L'étude de la différence de virulence des souches a été étudiée au niveau antigénique, enzymatique et très récemment, génétique.

Ainsi au **niveau antigénique**, le profil des souches RH, P et C est différent en Western blot et en immunoprécipitation : outre l'existence d'antigènes spécifiques à chaque souche, des antigènes communs aux souches P et C mais non détectés dans la souche RH sont mis en évidence (Ware and Kasper, 1987). De même, les travaux de Groß et col. montrent la présence d'un antigène de 23 kDa spécifique des souches virulentes (Gross, Müller et al., 1991).

L'étude des souches au **niveau enzymatique** a été réalisée par Dardé et col. (Dardé, Bouteille et al., 1988; Dardé, Bouteille et al., 1990; Dardé, Bouteille et al., 1992). Cinq zymodèmes (Multilocus Isoenzyme Genotype) ont ainsi été définis à partir de l'étude de 35 isolats parasitaires, sur la base de l'étude de 6 enzymes. Il n'existe pas de zymodème spécifique d'un site géographique ou d'une souche parasitaire. Le cinquième zymodème correspond à un isolat très pathogène chez la souris (Dardé, Bouteille et al., 1992). Trois de ces zymodèmes contiennent des souches permettant une infection chronique. Il ne semble pas y avoir de corrélation entre l'existence d'un zymodème particulier et l'infection humaine. L'application de ces études au développement d'une galerie "API" basée sur la recherche de 84 enzymes permet maintenant de classer chaque isolat parasitaire dans les zymodèmes (Manafi, Hassl et al., 1993).

Les différences observées au niveau antigénique et enzymatique ont ensuite été confirmées par la mise en évidence de l'existence d'un **polymorphisme génétique** (Cristina, Oury et al., 1991). L'étude de 6 souches différentes de *Toxoplasmes* en RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) a permis de définir 4 profils de restriction de l'ADN génomique mais sans corrélation apparente avec la virulence des souches. Bien que le *Toxoplasme* soit répandu partout dans le monde, dans toutes les espèces et qu'il se transmette selon de nombreuses voies, il apparaît que les souches virulentes sont génétiquement homogènes, que la structure de leur population est clonale (Sibley and Boothroyd, 1992c ; Boothroyd, 1993; Boothroyd and Sibley, 1993) et qu'elles définissent ainsi une seule espèce (Tibayrenc, 1993). Il n'y aurait donc pas de corrélation entre le génotype de la souche ou de l'hôte et la localisation géographique de l'isolat (Sibley and Boothroyd, 1992c). Au contraire, les souches de virulence plus modérée sont plus hétérogènes (Sibley and Boothroyd, 1992c ; Boothroyd, 1993). Le locus *SAG1* serait par exemple un bon marqueur pour étudier la virulence des souches : un des deux allèles du locus semble présent uniquement dans toutes les souches virulentes alors que l'autre allèle est retrouvé dans toutes les souches avirulentes (Boothroyd and Sibley, 1993).

L'analyse des isolats parasitaires de patients infectés par le VIH a permis de définir 3 génotypes différents dont 2 sont non virulents chez la souris. Le second génotype semble majoritaire parmi eux. Il existerait ainsi un lien statistique significatif entre l'existence d'un "marqueur" et une réactivation toxoplasmique (Sibley et col., en préparation).

V- STRUCTURE MOLECULAIRE DU TOXOPLASME

Parmi les quelques 1.000 protéines du Toxoplasme (Pfefferkorn, 1990), de nombreuses molécules antigéniques ont été mises en évidence par les techniques d'électrophorèse en gel de polyacrylamide, de radiomarquage et d'immunotransfert, que ce soit dans la fraction soluble ou insoluble du parasite (Handman, Goding et al., 1980 ; Hughes and Balfour, 1981 ; Johnson, 1985 ; Bessières, Le Breton et al., 1992). Certaines sont spécifiques de souche (Ware and Kasper, 1987), d'autres sont corrélées au degré de virulence (Dardé, Bouteille et al., 1988 ; Gross, Müller et al., 1991 ; Bohne, Gross et al., 1993).

Dans le cadre d'une stratégie vaccinale anti-toxoplasmique, les recherches se sont orientées vers deux grandes classes d'antigènes : les antigènes de surface du parasite et en particulier, SAG1 (ou P30, Burg, Perelman et al., 1988) et les antigènes de sécrétion.

1- Molécules de surface

Quatre antigènes majeurs de surface (molécules SAG) ont été décrits jusqu'à présent : P30 ou SAG1 (Burg, Perelman et al., 1988), P22 ou SAG2 (Prince, Auer et al., 1990), GP43 ou SAG3 (Cesbron-Delauw et col., en préparation) et une molécule de 35 kDa (P35 ou SAG4).

- Caractéristiques communes

Ces quatre molécules sont ancrées dans la membrane du tachyzoïte par un groupement glycosylphosphatidylinositol (GPI) composé d'un groupement inositol, d'une glucosamine et d'une éthanolamine (Nagel and Boothroyd, 1989 ; Tomavo, Schwarz et al., 1989) dont les précurseurs de synthèse ont été identifiés (Tomavo, Dubremetz et al., 1992a ; Tomavo, Dubremetz et al., 1992b). Le clonage et le séquençage des gènes codant pour ces antigènes (Burg, Perelman et al., 1988 ; Prince, Auer et al., 1990 ; Cesbron-Delauw et col., en préparation) a permis de montrer que l'organisation des protéines déduites de l'ADNc est identique : outre la présence d'une région N-terminale hydrophobe caractéristique des protéines exportées à l'extérieur de la cellule (Von Heijne, 1986), une autre séquence hydrophobe C-terminale caractérise l'ancrage GPI. Cette structure d'ancrage serait ensuite clivée par la phosphatidyl inositol phospholipase C (PIPLC) lors du "shedding" du parasite

(Tomavo, Schwarz et al., 1989). Le clivage de ce groupement par la PIPLC permet la formation d'un épitope commun entre toutes ces molécules de surface (Tomavo, Schwarz et al., 1989). Tout comme la sécrétion des organites cytoplasmiques (granules denses et rhoptries), ce phénomène de "shedding" permet la redistribution des molécules de surface dans le réseau de la vacuole parasitophore après l'invasion de la cellule-hôte.

Ces quatre molécules présentent également des processus de modifications post-traductionnelles communs : elles sont toutes phosphorylées sur les résidus sérine du coeur polypeptidique et sur les groupements éthanolamine et inositol de l'ancrage GPI. Le rôle exact de ces modifications post-traductionnelles n'est pas connu ; elles pourraient jouer un rôle important dans la conformation de la molécule et dans sa reconnaissance par le système immunitaire. Les kinases impliquées ne sont pas mises en évidence (Tomavo, Martinage et al., 1992). Par contre, même si des études ultrastructurales plus anciennes ont montré la présence d'un glycocalyx à la surface du parasite (Vivier and Petitprez, 1969), peu de molécules de surface semblent glycosylées (Mauras, Dodeur et al., 1980). L'antigène SAG1, par exemple, bien que possédant un site potentiel de N-glycosylation dans sa séquence primaire déduite de l'ADNc (Burg, Perelman et al., 1988), n'est pas glycosylé.

Les quatre antigènes majeurs de surface sont reconnus par tous les sérums humains d'infection chronique alors que seules, les molécules GP43 (SAG3) et P30 (SAG1) sont reconnues par les sérums de phase aiguë (Decoster, Darcy et al., 1988a). Parmi les molécules de surface clonées jusqu'à présent, seules ces deux molécules présentent des homologies au niveau de leur structure primaire (Cesbron-Delauw et col., en préparation).

- L'antigène majeur de surface P30 ou SAG1 (Kasper and Khan, 1993)

Cet antigène de 30 kDa qui représente 3 à 5% des protéines parasitaires du stade tachyzoïte, est distribué de façon homogène à la surface du parasite et dans son plasmalemme (Dubremetz, Rodriguez et al., 1985). Lors de l'invasion du parasite dans la cellule-hôte, cette protéine passe par la jonction mobile formée entre les membranes des deux cellules, est ainsi "rasée" ("shedded") de la surface du parasite puis redistribuée à la membrane de la vacuole parasitophore (Sibley, Krahenbuhl et al., 1986 ; Tomavo, Schwarz et al., 1989). Elle semblerait jouer un rôle important au cours de l'invasion puisque cette phase est partiellement inhibée par l'usage d'un anticorps monoclonal anti-P30 (Grimwood and Smith, 1992) : l'existence d'un récepteur glycosylé qui fixerait la P30, à la surface des cellules-hôtes, a été avancée (Kasper and Khan, 1993).

La molécule posséderait une région immunodominante contenant un épitope unique et répété (Rodriguez, Afchain et al., 1985 ; Santoro, Charif et al., 1986). La présence de cet épitope répété n'a cependant pas été confirmée par la séquence primaire de l'antigène de souche RH (Burg, Perelman et al., 1988). Huit acides aminés diffèrent entre la séquence de l'antigène de la souche RH (Burg, Perelman et al., 1988) et celle des antigènes des souches P et C mais ces différences ne semblent pas affecter les propriétés antigéniques de la molécule (Büllow and Boothroyd, 1991).

Cet antigène est fortement immunogène ; il induit une réponse IgM et IgG intense (Sharma, Mullenax et al., 1983 ; Santoro, Charif et al., 1986 ; Huskinson, Stepick et al., 1989), une réponse IgA (Decoster, Darcy et al., 1988a, 1988b ; Huskinson, Thulliez et al., 1990 ; Decoster, Slizewicz et al., 1991) et IgE (Pinon, Toubas et al., 1990 ; Godard, Darcy et al., 1990). Ces propriétés ont été mises à profit pour la mise au point de tests d'immunocapture détectant les IgM (Cesbron, Capron et al., 1985) et les IgA, marqueurs précoces de l'infection (Decoster, Darcy et al., 1988b ; Decoster, Slizewicz et al., 1991). Cet antigène induit la production de lymphocytes T producteurs d'IFN γ (Khan, Eckel et al., 1988) et de lymphocytes T cytotoxiques (Khan, Smith et al., 1988) ; il active également les macrophages dans leur activité toxoplasmicide (Makioka and Kobayashi, 1991).

L'antigénicité et l'immunogénicité de cette protéine en ont fait un candidat vaccinal de choix. Son rôle protecteur est cependant controversé (Kasper, Currie et al., 1985 ; Burg, Perelman et al., 1988 ; Makioka and Kobayashi, 1991). L'utilisation de liposomes (Büllo and Boothroyd, 1991) ou de nouveaux adjuvants tels que le Saponin Quil A (Khan, Smith et al., 1991) semblent cependant promettre de bons résultats de protection. De même, l'immunisation de souris par une construction octamérique dérivée du peptide 48-67 confère une protection de 40% (Darcy, Maes et al., 1992).

- Mutants déficients en protéines de surface

Afin de déterminer plus précisément le rôle des protéines de surface dans la biologie du parasite, des mutants déficients en ces protéines ont été construits. Un mutant déficient en protéine de surface P22 (SAG2) (Kasper, Crabb et al., 1982) et deux mutants déficients en P30 (SAG1) (Kasper, 1987) ont été isolés sur la base de leur résistance à la lyse par les anticorps monoclonaux correspondants. La croissance des deux mutants P30 *in vitro* est plus lente que celle du parasite sauvage. Le premier mutant produit une protéine P30 tronquée par suite d'une mutation non-sens localisée aux 2/3 de la séquence codante. Le second mutant résulte de la mutation d'une cystéine en lysine dans la séquence codante, ce qui aurait comme conséquence d'induire un mauvais repliement de la protéine dans l'espace et donc une mauvaise insertion dans la membrane du parasite (Kasper and Khan, 1993).

2- Molécules de rhoptries

- Rôle des protéines de rhoptries dans l'invasion cellulaire

Les rhoptries contiennent de nombreuses molécules (Hérion, Hernandezpando et al., 1993) et notamment, de nombreux polypeptides polycationiques (de Souza and Souto-Pradon, 1978 ; Werk, Dunker et al., 1984) riches en lysine, histidine, et arginine. Ces molécules de rhoptries sont impliquées dans les phénomènes d'invasion de la cellule-hôte. Leur activité "Penetration Enhancing Factor" ou **PEF** est décrite depuis 1966 : ce facteur permettrait d'augmenter de 30% la pénétration du Toxoplasme dans la cellule-hôte, en dégradant par

exemple la surface muqueuse des cellules-hôtes (Lycke and Norrby, 1966; Lycke, Norrby et al., 1968; Lycke, Carlberg et al., 1975).

L'obtention d'anticorps monoclonaux a depuis, permis d'identifier une dizaine de molécules 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). Le signal qui oriente les polypeptides issus du système réticulum-Golgi vers les rhoptries est inconnu (Perkins, 1992). Ces protéines subiraient une maturation (clivage) avant leur sécrétion (Sadak, Taghy et al., 1988). Une phospholipase A2, sécrétée par les rhoptries sous l'influence du Ca^{2+} ou liée à la membrane des rhoptries (Saffer, Long et al., 1989; Saffer and Schwartzman, 1991), agirait sur la fluidité membranaire de la cellule-hôte lors de l'invasion, notamment en mobilisant l'acide arachidonique à partir des phospholipides de membrane (Thardin, M'Rini et al., 1993). Cette enzyme serait donc impliquée dans les processus d'invasion en "digérant" les phospholipides de la membrane de la cellule-hôte (Saffer, Long et al., 1989; Saffer and Schwartzman, 1991). La participation d'une ATPase- Ca^{2+} dépendante semble également nécessaire lors du processus d'invasion (Nichols, Chiappino et al., 1983). Les protéines de rhoptries et notamment, 3 composants de 66 kDa (Kimata and Tanabe, 1987), 55-60 kDa (ROP1) (Saffer, Mercereau-Puijalon et al., 1992) et 42 kDa (Dubremetz, Sadak et al., 1987) sont ainsi détectés en association avec la membrane de la vacuole parasitophore pendant quelques heures après l'invasion (Kimata and Tanabe, 1987; Saffer, Mercereau-Puijalon et al., 1992). Ces molécules sembleraient donc impliquées dans les mécanismes précoces de formation et de modification de la vacuole parasitophore. Elles pourraient par exemple participer à la formation des microtubules de la vacuole parasitophore (Vivier and Petitprez, 1969). De plus, les polyamines sécrétées par les rhoptries, en altérant les charges négatives membranaires, favoriseraient l'adhésion entre les membranes ; leur disparition de la membrane de la vacuole après plusieurs cycles de division parasitaire semblerait cependant indiquer qu'elles ne seraient pas responsables du maintien de l'incompétence de la vacuole à fusionner avec les lysosomes (Saffer, Mercereau-Puijalon et al., 1992).

- Caractérisation moléculaire des protéines de rhoptries

Deux protéines ont été caractérisées jusqu'à ce jour. **ROP1** (Ossorio, Schwartzman et al., 1992) est reconnue par un anticorps monoclonal qui bloque l'activité du PEF (Penetrating Enhancing Factor) ; elle serait donc ou ferait partie de ce facteur d'invasion (Schwartzman and Krug, 1989). Le séquençage du gène *ROP1* a montré que la région N-terminale de la protéine est acide et riche en résidus proline alors que la partie C-terminale est basique, riche en résidus glycine. Elle participerait à la complexation du calcium, en association avec d'autres protéines (Ossorio, Schwartzman et al., 1992). Bien que non transmembranaire, elle serait associée à la membrane de la vacuole parasitophore lors de l'invasion.

La protéine **ROP2** serait quant à elle identique à l'antigène de 54 kDa cloné par Saavedra et col. sur la base de sa capacité à induire la prolifération d'un clone T CD4^+

humain réactif pour *T. gondii* et producteur d'IL2 et d'IFN γ (Saavedra, De Meuter et al., 1991; Saavedra and Herion, 1991). L'analyse de la séquence en acides aminés déduite de l'ADNc révèle la présence d'une région transmembranaire. ROP2 ferait partie d'une famille de protéines basiques comprenant ROP2, ROP3 et ROP4 : ces protéines qui partagent des déterminants antigéniques interagissent également avec la membrane de la vacuole parasitophore (Leriche and Dubremetz, 1991).

3- Molécules de micronèmes

Trois molécules communes aux micronèmes des tachyzoïtes et des bradyzoïtes ont été décrites jusqu'à présent chez *T. gondii* : MIC1, de 60 kDa, MIC2 de 120 kDa et MIC3 de 90 kDa, cette dernière molécule étant un homodimère comprenant deux sous-unités de 38 kDa reliées par des ponts disulfures (Achbarou, Mercereau-Puijalon et al., 1991a). Le rôle exact de ces protéines n'est pas connu. La mise en évidence de protéines de micronèmes dans des espèces protozoaires proches du Toxoplasme telles que *Eimeria*, *Sarcocystis* (Dubremetz and Dissous, 1980; Entzeroth, Kerckhoff et al., 1992) ou *Plasmodium* semble cependant indiquer que l'exocytose des micronèmes aurait lieu avant l'invasion et qu'ils délivreraient des molécules impliquées dans la reconnaissance de la cellule-hôte ou l'attachement du parasite avant l'invasion (Entzeroth, Kerckhoff et al., 1992; Dubremetz, Achbarou et al., 1993).

4- Molécules de granules denses

Antigènes d'Excrétion-Sécrétion (AES)

Même si les antigènes membranaires sont des cibles privilégiées de la réponse immune, l'étude d'autres infections parasitaires a montré que les antigènes d'excrétion-sécrétion (AES) sont eux aussi des molécules très immunogènes qui peuvent posséder des activités enzymatiques très variées et être transitoirement exposées à la surface du parasite. Dans le cas de la toxoplasmose, les antigènes sécrétés induiraient également une stimulation lymphocytaire plus élevée que les antigènes somatiques (Hughes, Gonzalez et al., 1985).

Les AES sont à distinguer des antigènes appelés "**exoantigènes**" qui sont excrétés par les tachyzoïtes dans les surnageants de cultures cellulaires infectées par le parasite (Hughes and van, 1982; Chumpitazi, Ambroise-Thomas et al., 1983; Chumpitazi, Ambroise et al., 1987). Ces antigènes semblent toujours contaminés par les composants de la cellule-hôte et leur rôle protecteur n'a pas été démontré (Roques, Bessières et al., 1986).

Un procédé d'obtention des AES dans un milieu de culture acellulaire mais en présence de sérum, a permis de maintenir un bon niveau de viabilité des parasites et donc de réduire la contamination par les antigènes somatiques lors de la sécrétion des AES (Darcy, Deslée et al., 1988). Ces composants antigéniques constituent de par leur immunogénicité et

leur topologie, des cibles potentielles de la réponse immune. En effet, leur immunogénicité a pu être mise en évidence à la fois lors de l'infection humaine (Decoster, Darcy et al., 1988a) et expérimentale (Darcy, Deslée et al., 1988). De plus, leur rôle protecteur a été démontré dans deux modèles expérimentaux de la toxoplasmose. Le rat "nude", congénitalement athymique et naturellement susceptible à l'infection, est protégé d'une infection létale par la souche RH grâce au transfert passif de sérum de rat Fisher immunisés par les AES (Darcy, Deslée et al., 1988) ou de lymphocytes T spécifiques (Duquesne, Auriault et al., 1990). Une protection de 70% des souris est également obtenue après immunisations par les AES et une infection orale par 1200 kystes de la souche 76K (Darcy, Maes et al., 1992). L'immunisation par les AES préviendrait aussi le passage du parasite au travers de la barrière placentaire chez le rat (Zenner et col., en préparation).

Certains de ces AES produits par les tachyzoïtes présentent des épitopes communs aux antigènes de bradyzoïtes (Darcy, Charif et al., 1990). Ces antigènes, communs aux deux stades du parasite, constitueraient les bases moléculaires de l'immunité concomitante (Capron and Dessaint, 1988) et sont donc considérés comme des candidats de choix pour le développement d'un vaccin sous-unité.

La production d'anticorps monoclonaux dirigés contre certains des composants des AES (Charif, Darcy et al., 1990) a permis de montrer que bon nombre d'entre eux sont constitués par les molécules sécrétées par les granules denses.

Molécules de granules denses

De nombreux composants des granules denses sont maintenant décrits. La coexistence de ces molécules à l'intérieur des mêmes granules n'a pas été clairement mise en évidence ; leur sécrétion dans la vacuole parasitophore après l'invasion de la cellule-hôte est par contre maintenant bien décrite (Cesbron-Delauw, Guy et al., 1989; Charif, Darcy et al., 1990; Leriche and Dubremetz, 1990; Leriche and Dubremetz, 1991; Achbarou, Mercereau-Puijalon et al., 1991b ; Sibley and Boothroyd, 1992a ; Dubremetz, Achbarou et al., 1993).

De nombreuses molécules sont maintenant décrites. Outre la mise en évidence de 5 antigènes (60, 40, 35, 28 et 27 kDa) par Matsuura et col. (Matsuura, Tegoshi et al., 1992), un antigène de 32 kDa issu des granules denses est retrouvé en association avec le réseau intraphagosomal (Sibley and Krahenbuhl, 1988). Cet antigène a également été décrit par Linder et col. (Linder, Thors et al., 1992).

Les antigènes de granules denses clonés et séquencés sont maintenant dénommés molécules **GRA** (Sibley, Pfefferkorn et al., 1991). Six molécules différentes ont ainsi été définies jusqu'à présent.

L'obtention d'anticorps monoclonaux (Charif, Darcy et al., 1990) a permis dans notre laboratoire, d'étudier au niveau subcellulaire et moléculaire, certains des antigènes de granules denses (GRA1, GRA2 et GRA5) sécrétés par les tachyzoïtes en milieu acellulaire et

en présence de sérum (Darcy, Deslée et al., 1988) mais également exprimés par le stade bradyzoïte (Darcy, Charif et al., 1990 ; Torpier, Charif et al., 1993).

L'antigène **GRA1** ou P23 (23 kDa), reconnu par l'anticorps monoclonal TG17-43 (Charif, Darcy et al., 1990), présente une structure caractéristique en α -hélice-boucle- α -hélice capable de fixer le calcium (Cesbron-Delauw, Guy et al., 1989; Cesbron-Delauw, Pierce et al., 1989). Cette propriété a été démontrée expérimentalement à la fois sur l'antigène natif (Charif, Darcy et al., 1990) et recombinant (Cesbron-Delauw, Guy et al., 1989). Cette molécule sécrétée par les granules denses après l'invasion de la cellule-hôte est alors distribuée de façon homogène dans la matrice de la vacuole parasitophore (Sibley, Krahenbuhl et al., 1986; Cesbron-Delauw, Guy et al., 1989; Leriche and Dubremetz, 1990; Achbarou, Mercereau-Puijalon et al., 1991b). L'utilisation de peptides synthétiques dérivés de la séquence a par ailleurs permis d'identifier deux épitopes T (170-193) et (194-208) dans la région C-terminale de la molécule. Le premier peptide correspond en outre, à l'épitope B reconnu par l'anticorps monoclonal TG17-43 (Duquesne, Auriault et al., 1991).

Des études antérieures ont montré que le transfert passif de l'anticorps monoclonal F3G3 (Handman and Remington, 1980) dirigé contre deux composants de 28 et 58 kDa (Sibley and Sharma, 1987) d'une part et que l'immunisation à l'aide de ce composé antigénique **F3G3** purifié par affinité d'autre part, protégeaient la souris contre une infestation létale par la souche C56 (Sharma, Araujo et al., 1984). Des titres élevés en anticorps (Sharma, Araujo et al., 1984) et en particulier, une réponse IgG spécifique (Brinkmann, Remington et al., 1993) ainsi qu'une réponse cellulaire T importante (Sharma, Araujo et al., 1984) semblent générés par ce composé antigénique. On sait aujourd'hui que la vaccination des souris par l'antigène F3G3 purifié par affinité est surtout due à l'activation de lymphocytes T CD4⁺ (Brinkmann, Remington et al., 1993). L'épitope F3G3 reconnu par l'anticorps monoclonal du même nom serait un composant du réseau intravacuolaire (Sibley and Sharma, 1987). Le composant de 28 kDa reconnu par l'anticorps monoclonal F3G3 (Sibley and Sharma, 1987) s'est en fait révélé être identique à l'antigène de 28 kDa (**GRA2**) reconnu par l'anticorps monoclonal TG17-179 (Charif, Darcy et al., 1990). Cette molécule est O-glycosylée sur ses résidus sérine et thréonine (Charif, Darcy et al., 1990; Achbarou, Mercereau-Puijalon et al., 1991b ; Schwarz and Tomavo, 1993). L'utilisation de TG17.179 dans des immunomarquages à l'or colloïdal a permis d'étudier plus finement la localisation de l'antigène GRA2 qui est ainsi détecté en étroite association avec le réseau membranaire intravacuolaire, sous le plasmalemme des parasites et dans la paroi des kystes (Charif, Darcy et al., 1990 ; Torpier, Charif et al., 1993) (figures 6 et 7). Ces résultats obtenus dans le laboratoire confirment les résultats décrits par Sibley et col. (Sibley and Sharma, 1987) et par Achbarou et col. (Achbarou, Mercereau-Puijalon et al., 1991b).



Figure 7 : Immunolocalisation ultrastructurale de l'antigène GRA2 sur des sections de kystes intracérébraux (d'après Torpier, Charif et al., 1993)

L'immunomarquage par l'anticorps monoclonal TG17-179 (Charif, Darcy et al., 1990) est localisé dans les granules denses (**D**) des bradyzoïtes (**Bz**) et dans la paroi kystique (**CW**).

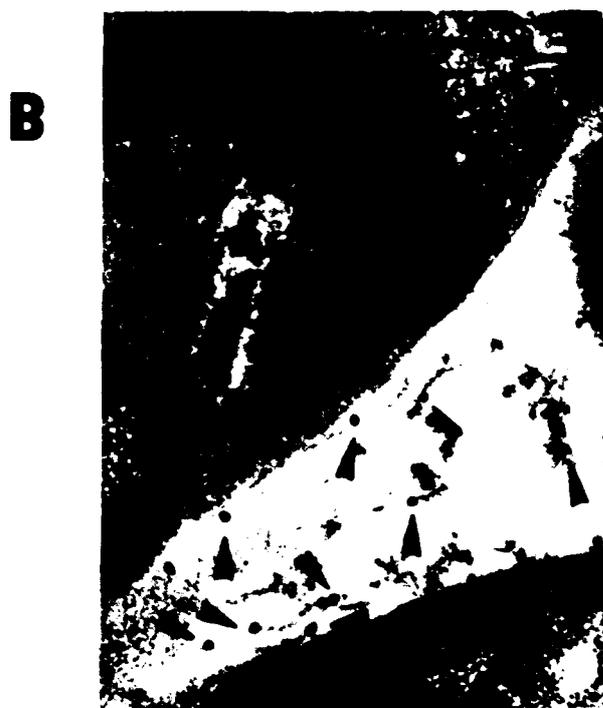
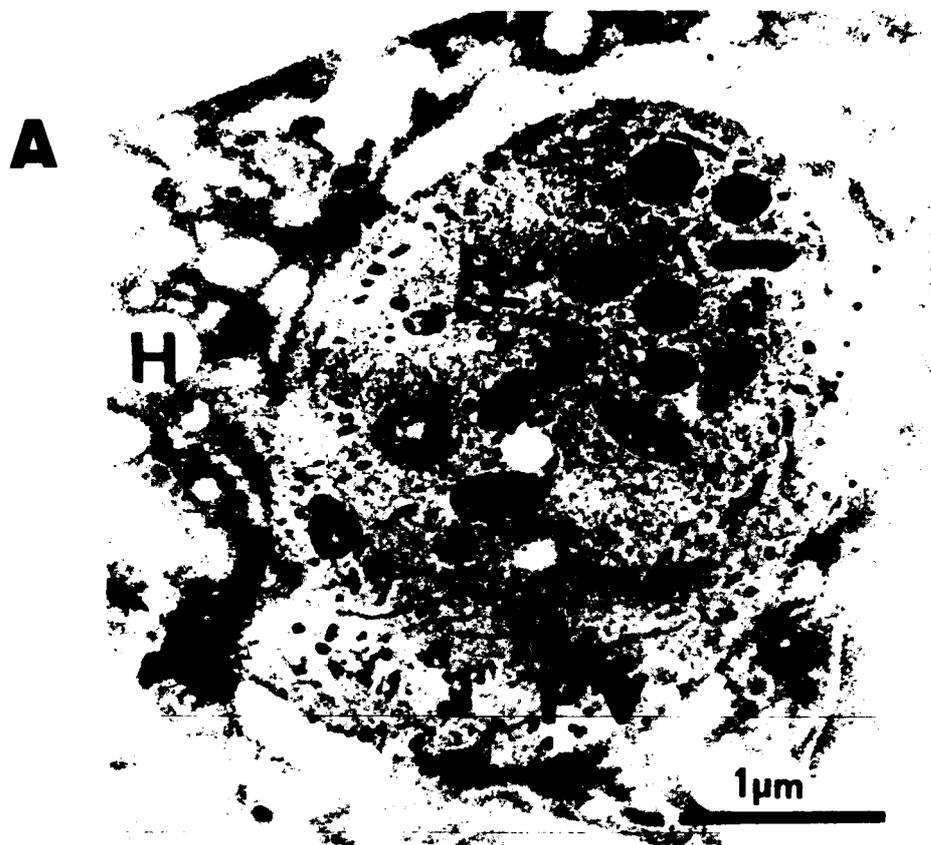


Figure 6 : Immunomarquage à l'or colloïdal de la protéine GRA2, réalisé à l'aide de l'AcMc TG17-179 (Charif, Darcy et al., 1990) sur des tachyzoïtes intracellulaires

A : La protéine GRA2 est détectée dans les granules denses du tachyzoïte (**d**) et dans la vacuole parasitophore (**PV**). **H** : cellule-hôte ; **R** : rhoptrie.(Charif, Darcy et al., 1990)

B : Détail de la vacuole parasitophore : les particules d'or sont détectées en association avec des sections longitudinales du réseau intravacuolaire (têtes de flèches). (d'après Torpier, Charif et al., 1993)

Des études complémentaires ont montré que GRA2 ou P28 est un très bon immunogène puisque cette protéine est reconnue par tous les sérums humains de phase chronique (Decoster, Darcy et al., 1988a), par les sérums de rat, de lapin et de souris immunisés par les AES (Darcy, Deslée et al., 1988). De plus, le rôle protecteur de la protéine GRA2 purifiée par HPLC a été démontré dans le modèle souris : 75% des souris immunisées par une fraction enrichie en GRA2, en présence d'adjuvant incomplet de Freund, sont protégées vis-à-vis d'une infection orale et létale par 1200 kystes de la souche 76K (Cesbron-Delauw et col., résultats non publiés).

GRA3, une molécule de 30 kDa, est associée au réseau de la vacuole parasitophore ainsi qu'à sa membrane. Cette molécule pourrait constituer un canal transporteur de métabolites au travers de cette membrane (Achbarou, Mercereau-Puijalon et al., 1991b). Des filaments marqués par l'anticorps monoclonal anti-GRA3 sont aussi mis en évidence hors de la vacuole parasitophore, dans le cytoplasme de la cellule-hôte ; le rôle de ces filaments au sein de la cellule infectée n'est pas clairement défini (Dubremetz and Schwartzman, 1993).

GRA4, un antigène de 40 kDa, glycosylé, peu chargé et riche en résidus proline, est associé au réseau de la vacuole parasitophore après l'invasion (Achbarou, Mercereau-Puijalon et al., 1991; Mévelec, Chardès et al., 1992). Cette molécule pourrait faire partie des protéines de structure de la vacuole parasitophore (Mévelec, Chardès et al., 1992). Cet antigène est également reconnu par les IgA sécrétoires (Chardès, Bourguin et al., 1990; Chabasse, Berthelot et al., 1983; Chardès and Bout, 1993; Chardès, Velge-Roussel et al., 1993).

L'antigène **GRA5** ou P21 est un antigène de 21 kDa reconnu par l'anticorps monoclonal TG17-113 (Charif, Darcy et al., 1990). La présence d'une région centrale hydrophobe transmembranaire (Lecordier, Mercier et al., 1993) explique parfaitement la présence de cette molécule en association avec la membrane de la vacuole parasitophore et dans la paroi des kystes (Torpier, Charif et al., 1993). Une réactivité antigénique croisée avec GRA5, des propriétés structurales communes et une localisation sub-cellulaire identique ont de plus permis de caractériser une protéine de 32 kDa, par la suite dénommée **GRA6** (Lecordier, Dubremetz et al., in preparation). Cette protéine contient une région hydrophobe centrale présentant les caractéristiques d'une région transmembranaire et elle présente des homologies avec les protéines de structure fibreuse du règne animal ; elle pourrait donc faire partie des protéines fibreuses transmembranaires qui entrent dans la constitution du réseau intravacuolaire (Lecordier, Dubremetz et al., in preparation).

BUT DU TRAVAIL

La stratégie développée dans notre laboratoire pour identifier des antigènes à potentialités vaccinales a permis de mettre en évidence l'immunogénicité et le rôle protecteur des Antigènes d'Excrétion-Sécrétion (AES) dans divers modèles de toxoplasmose expérimentale (Darcy, Deslee et al., 1988; Zenner, Darcy et al., 1993; Zenner et col., résultats non publiés). L'obtention d'anticorps monoclonaux dirigés contre ces AES (Charif, Darcy et al., 1990) a permis de montrer que les composants majeurs de ces antigènes appartiennent à une classe de molécules stockées dans les organites de sécrétion du parasite appelés "granules denses". Ces molécules ont donc par la suite été dénommées molécules "GRA" (Sibley, Pfefferkorn et al., 1991).

Le Toxoplasme, parasite intracellulaire obligatoire, se multiplie au sein d'une vacuole parasitophore qui résiste à la fusion avec les compartiments endocytiques de la cellule-hôte. Très rapidement après le processus d'invasion du parasite dans la cellule-hôte, la structure de la vacuole parasitophore est modifiée par l'élaboration d'un réseau de tubules membranaires qui assurent la connexion entre le Toxoplasme et la membrane de la vacuole. Les protéines parasitaires sécrétées à partir des granules denses entrent dans la composition de ce réseau. Elles sont cependant ciblées vers des domaines spécifiques de la vacuole et peuvent ainsi, selon leur localisation, être classées en différentes catégories. Certaines de ces molécules, par exemple GRA5, se retrouvent associées à la membrane de la vacuole parasitophore ou à la paroi du kyste. D'autres, telles que GRA1, sont réparties de façon plus homogène dans l'espace vacuolaire où elles semblent spécifiquement associées à la matrice de cette vacuole. Une troisième classe de protéines est représentée par les molécules telles que GRA2 (une glycoprotéine de 28 kDa) qui sont étroitement associées au réseau après leur sécrétion dans la vacuole parasitophore (pour revue, Cesbron-Delauw, Mercier et al., 1993 ; Cesbron-Delauw, soumis).

Dans ce cadre, afin de définir le rôle joué par la molécule GRA2 dans le développement intracellulaire du parasite et son implication sur les fonctions immunologiques de l'hôte, ce travail avait pour but de caractériser les bases moléculaires de l'expression de l'antigène GRA2.

A des fins à la fois fondamentales et appliquées, cet objectif comprenait donc

- la caractérisation moléculaire du gène codant pour GRA2 ;
- la production de molécules recombinantes et leur utilisation pour l'exploration des potentialités immunogéniques de l'antigène GRA2 ;
- ainsi que la mise en évidence du promoteur de transcription du gène *GRA2*.

2ÈME PARTIE

RESULTATS

I- CARACTERISATION MOLECULAIRE DE L'ANTIGENE GRA2

- p. 62 : Molecular and Biochemical Parasitology **58** (1993) 71-82

Si de nombreux travaux ont visé à l'identification d'antigènes protecteurs contre l'infection toxoplasmique, ceux-ci concernent principalement les antigènes de surface spécifiques du stade tachyzoïte et en particulier, l'antigène majeur de surface SAG1 (ou P30) (Burg, Perelman et al., 1988; Kasper and Khan, 1993). Le rôle protecteur de cet antigène ou d'une construction peptidique dérivée a en effet été récemment mis en évidence dans le modèle murin (Büllow and Boothroyd, 1991; Khan, Smith et al., 1991; Darcy, Maes et al., 1992).

La stratégie développée dans notre laboratoire en matière d'identification d'antigènes protecteurs est basée sur la notion que les antigènes d'Excrétion-Sécrétion (AES) du parasite constituent de par leur immunogénicité et leur topologie, des cibles potentielles de la réponse immune. En effet, l'immunité protectrice induite par l'immunisation à l'aide des AES a pu être démontrée dans les différents modèles expérimentaux développés dans le laboratoire. Ainsi, l'immunisation de souris par les AES permet d'assurer 70% de protection (en terme de survie) contre une infection létale (Darcy, Torpier et al., 1992). De même, le transfert passif d'anticorps anti-AES au rat "nude" permet la survie prolongée après une infection "challenge" (Darcy, Deslee et al., 1988) ; le transfert passif de lymphocytes T spécifiques des AES permet une protection totale (Duquesne, Auriault et al., 1990). De plus, l'immunisation de rates par les AES avant gestation permet de prévenir le passage transplacentaire du parasite et de protéger 97% des foetus (Zenner, Darcy et al., 1993; Zenner et col., résultats non publiés).

L'importance des AES dans la protection contre la toxoplasmose a conduit à caractériser au niveau sub-cellulaire, 4 des composants de cette préparation antigénique, sélectionnés sur la base de leur expression par les deux stades parasitaires, tachyzoïte et bradyzoïte (Darcy, Charif et al., 1990). Parmi eux, un composant de 28 kDa (PM apparent) nommé GP28.5 ou GRA2 (Sibley, Pfefferkorn et al., 1991) s'est révélé être un immunogène majeur des AES (Darcy, Deslée et al., 1988). L'utilisation de l'AcMc TG17-179 (Charif, Darcy et al., 1990) en microscopie électronique a permis de localiser l'antigène GRA2 :

- dans les granules denses des tachyzoïtes et des bradyzoïtes ;
- dans la vacuole parasitophore, en association au réseau tubulo-membranaire ;
- dans la paroi des kystes (Charif, Darcy et al., 1990; Torpier, Charif et al., 1993).

Or, lors de l'invasion active du parasite dans la cellule-hôte, la vacuole parasitophore qui se forme perd rapidement les marqueurs classiques de la membrane plasmique de la cellule, résiste à la fusion avec les compartiments endocytiques de la cellule-hôte et garde un pH neutre (Sibley, Weidner et al., 1985; Joiner, Fuhrman et al., 1990). Très vite après le

processus d'invasion s'opère la maturation de cette vacuole. Elle est entre autres assurée par la sécrétion du contenu des granules denses et par la formation du réseau de tubules membranaires dans l'espace intravacuolaire (Sibley, Krahenbuhl et al., 1986; Cesbron-Delauw, Guy et al., 1989; Charif, Darcy et al., 1990), ce réseau assurant la connexion entre la membrane du parasite et la membrane vacuolaire. La vacuole parasitophore constitue donc une zone importante d'interface, de communication et d'échanges entre le parasite et la cellule-hôte. Le rôle des molécules sécrétées à partir des granules denses, dans les processus de survie cellulaire et d'échappement du parasite aux mécanismes de défense mis en jeu par la cellule-hôte est donc postulé. Dans ce cadre, afin d'obtenir les outils moléculaires nécessaires à l'étude de la fonction des molécules de granules denses dans l'interaction hôte-parasite, le clonage des gènes codant pour GRA1, (Cesbron-Delauw, Guy et al., 1989), GRA5, (Lecordier, Mercier et al., 1993), GRA6, (Lecordier, Dubremetz et al., in preparation) et en particulier, pour GRA2 a donc été entrepris dans le laboratoire.

Isolement des clones d'ADNc

Les premiers clones d'ADNc ont été obtenus à la suite du criblage en expression d'une banque construite dans le vecteur λ gt11 (Cesbron-Delauw, Boutillon et al., 1992) à l'aide de l'AcMc TG17.179 (Charif, Darcy et al., 1990). Trois clones ont ainsi été obtenus, FM3 (450 pb), FM1 (550 pb) et FM16 (650 pb). Ils se recouvrent tous à partir de leur extrémité 3', codent pour la région C-terminale de GRA2 et contiennent une queue 3' non codante de 393 pb avant la queue poly (A) (Cesbron-Delauw, Boutillon et al., 1992).

Un criblage complémentaire d'une banque d'expression construite dans le vecteur λ ZapII, à l'aide de l'AcMc TG17.179, a permis l'isolement de nombreux clones dont le plus long (clone L) contient 1030 pb et code potentiellement pour un polypeptide de 212 acides aminés.

Homologie avec la séquence du gène codant pour l'antigène P28

L'étude de la séquence du clone d'ADNc L (1030 pb) a révélé une homologie parfaite avec celle du gène codant pour la molécule P28. Cette séquence contient un cadre ouvert de lecture de 756 pb codant potentiellement pour un polypeptide de 252 acides aminés (PM théorique 28 kDa) (Prince, Araujo et al., 1989).

La molécule P28 correspond à l'un des constituants du composé antigénique F3G3, reconnu par l'AcMc du même nom (Handman and Remington, 1980) et purifié par chromatographie d'affinité (Sharma, Araujo et al., 1984). Ce composé antigénique F3G3 qui comprend deux molécules de 28 kDa (P28) et 58 kDa (Sibley and Sharma, 1987) s'est révélé protecteur dans le modèle souris (Sharma, Araujo et al., 1984). L'épitope reconnu par l'AcMc F3G3 a été localisé sous la membrane du tachyzoïte et dans les vésicules formées à partir de la membrane plasmique du tachyzoïte lors de l'entrée du parasite dans la cellule (Sibley and Sharma, 1987).

L'homologie de 100% entre la séquence d'ADNc du clone L (1030 pb) et celle de P28 (1051 pb) (Prince, Araujo et al., 1989) nous laissait supposer que la séquence du clone L n'était pas complète dans sa région 5' et qu'il y manquait 121 pb.

Cependant, même après de nombreux criblages de la banque d'ADNc, par hybridation avec un fragment 5' d'ADNc issu du clone L et utilisé comme sonde, nous n'avons jamais pu isoler de clone plus long en 5' que le clone L. Cette observation nous laissait donc penser que ce clone correspondait en fait à la copie complète du messenger codant pour GRA2.

Caractérisation du gène GRA2

Afin de vérifier cette hypothèse, la banque d'ADN génomique de tachyzoïte construite dans le vecteur EMBL3 (Cesbron-Delauw, Guy et al., 1989) fut criblée avec la sonde 5' d'ADNc issue du clone L. L'analyse de l'un des trois clones obtenus par Southern blot ainsi que les expériences de protection à la nucléase S1 et d'extension d'amorce ont montré que le gène *GRA2* (1.3 Kb), probablement unique dans le génome du *Toxoplasme*, est constitué de deux exons séparés par un intron de 241 pb dont les sites donneur et accepteur d'épissage sont homologues au consensus AG/gt.....cag/GX. Une séquence 5' non traduite de 103 pb riche en T et une séquence 3' non codante de 392 pb sont caractérisées de part et d'autre du cadre de lecture ouvert. Une seule population de messagers a été mise en évidence, leur taille (1.1 Kb) correspondant à celle du clone d'ADNc L.

Le seul cadre de lecture ouvert déduit de la séquence du gène *GRA2* code potentiellement pour un polypeptide de 185 a. a. (PM théorique : 19.8 kDa) dont le seul codon ATG se trouve dans un environnement nucléotidique favorable pour initier la traduction chez les eucaryotes supérieurs (Kozak, 1986) et chez *T. gondii* (Ossorio, Schwartzman et al., 1992).

La séquence du polypeptide déduit de l'ADNc a été confirmée partiellement par le microséquençage de fragments peptidiques obtenus après digestion trypsique de la protéine *GRA2* purifiée par HPLC.

Divergence entre P28 (Prince, Araujo et al., 1989) et GRA2 (Mercier, Lecordier et al., 1993)

L'ensemble de ces résultats mettaient en évidence une différence entre la séquence d'ADNc obtenue dans notre laboratoire et la séquence publiée par Prince et col., la séquence codant pour P28 contenant 67 a. a. supplémentaires dans la région N-terminale. Ces 67 a. a. comprennent 3 résidus isoleucine alors que le reste de la protéine n'en contient pas (Prince, Araujo et al., 1989). Le marquage métabolique d'AES par l'[³H]-isoleucine suivi de l'immunoprécipitation par le sérum de souris dirigé contre la protéine *GRA2* purifiée par HPLC, ne révéla aucune bande, même après une exposition autoradiographique prolongée, confirmant ainsi l'absence d'isoleucine dans la protéine *GRA2* native.

La divergence obtenue dans les séquences d'ADNc pouvait être due au fait que la séquence d'ADNc codant pour P28 avait été obtenue par recouvrement partiel de 6 clones d'ADNc différents, codant pour au moins 2 protéines différentes de *Toxoplasma gondii* (Prince, Araujo et al., 1989). Cette observation était à mettre en relation avec la mise en évidence par Prince et col. de 4 populations d'ARN messagers (1.4, 1.1, 0.9 et 0.6 Kb) (Prince, Araujo et al., 1989) alors qu'une seule population de 1.1 Kb avait été détectée dans nos expériences. La population de 1.4 Kb rapportée par Prince et col. pouvait aisément être considérée comme le pré-messager de la population de 1.1 Kb, avant épissage de l'intron de 300 pb. Les deux espèces minoritaires de 0.9 et 0.6 Kb pouvaient quant à elles, correspondre aux messagers d'un second gène, la sonde d'ADNc ayant servi à l'hybridation du northern blot contenant la portion d'ADNc 5' additionnelle. A ce stade cependant, l'hypothèse d'un épissage alternatif en relation avec les souches parasitaires différentes et non synchrones utilisées par les deux laboratoires ne pouvait pas être exclue.

L'ensemble de ces problèmes a par la suite été souligné par Parmley et col., lors de la publication de la séquence corrigée d'ADNc codant pour P28 ainsi que de la séquence génomique correspondante (Parmley, Sgarlato et al., 1993).

Deux différences mineures, sans doute dues à la différence d'isolats parasitaires, persistent entre la séquence génomique de la molécule GRA2 et la séquence génomique de P28 (Parmley, Sgarlato et al., 1993). Ces deux différences concernent deux des régions non codantes du gène (intron et région 3' non traduite).

Caractéristiques de la séquence primaire de GRA2

L'analyse de la séquence primaire déduite de l'ADNc codant pour GRA2 révèle la présence d'une séquence hydrophobe N-terminale qui semble correspondre à une séquence signal (Von Heijne, 1986). Cette caractéristique est à mettre en relation avec le trafic intracellulaire de la protéine (Charif, Darcy et al., 1990).

Les nombreux résidus sérine et thréonine présents dans la séquence primaire de la protéine se sont révélés être les sites d'addition de chaînes O-glycosylées (Schwarz and Tomavo, 1993). Les deux régions "PEST" riches en Proline (P), Acide Glutamique (E), Sérine (S) et Thréonine (T) (Rogers, Wells et al., 1986) présentes dans la séquence en acides aminés de la protéine sembleraient indiquer que la protéine GRA2 est sensible aux endoprotéases et que son temps de demi-vie serait donc très court.

Quelques hypothèses sur la fonction de GRA2

L'analyse de la structure secondaire prédite à partir de la séquence primaire met en évidence un large domaine central hydrophobe de 66 a. a. (69-144). En particulier, les acides aminés des régions 69-87 et 98-116 pourraient être arrangés sous forme de deux α -hélices amphiphiles. La longueur des deux hélices (19 a. a.) semble suffisante pour traverser la

bicouche lipidique des membranes : l'homo- ou l'hétéro-dimérisation de GRA2 pourrait ainsi permettre la formation d'un pore. L'association anti-parallèle des deux α -hélices pourrait également permettre d'exposer vers l'extérieur des hélices, la surface hydrophile et les charges négatives des acides glutamiques qu'elles contiennent. L'interaction électrostatique de ces charges avec les phospholipides membranaires pourrait alors expliquer l'association de la protéine GRA2 aux membranes. Cette association particulière permettrait de classer la protéine dans la famille des protéines amphipatiques qui sont hydrosolubles mais qui peuvent s'associer aux phospholipides des membranes en présence de calcium. Cette hypothèse est à mettre en rapport avec l'observation effectuée par Sibley et Boothroyd (Sibley and Boothroyd, 1992) qui rapportent que la sécrétion de GRA2 est régulée par le calcium et qu'une forme soluble ainsi qu'une forme membranaire de la protéine peuvent être observées. En outre, il a été démontré que certaines protéines amphitropiques interagissent avec des protéines contenant des "EF-hands". Les "EF-hands" sont des structures en α -hélice-boucle- α -hélice caractéristiques des protéines fixant le calcium (Burn, 1988). Or, GRA1 contient 2 "EF-hands" et fixe effectivement le calcium (Cesbron-Delauw, Guy et al., 1989; Charif, Darcy et al., 1990) ; elle constitue d'ailleurs la seule protéine de granule dense pour laquelle une propriété a pu être démontrée. Dans ce contexte, une interaction fonctionnelle entre les deux protéines GRA1 et GRA2 pourrait être envisagée, ces deux protéines présentant un trafic intracellulaire similaire (stockage dans les granules de sécrétion, sécrétion simultanée lors de l'invasion de la cellule-hôte, ciblage dans la vacuole parasitophore). GRA1 pourrait ainsi être le transporteur des ions calcium nécessaires à l'ouverture de la porte du canal constitué par GRA2 ; GRA1 pourrait également agir comme "tampon" permettant, selon les besoins du parasite, d'apporter le calcium nécessaire pour mobiliser GRA2 et l'associer aux membranes afin de permettre son activité par ailleurs encore inconnue.

L'isolement de clones d'ADNc codant pour l'antigène GRA2 et la connaissance de la structure de son gène nous ont permis dans un second temps, d'exprimer la molécule sous forme recombinante, ceci afin de disposer d'une source de protéine plus importante et de pouvoir en explorer son immunogénicité ainsi que son antigénicité.

MOLBIO 01906

Molecular characterization of a dense granule antigen (Gra 2) associated with the network of the parasitophorous vacuole in *Toxoplasma gondii*

Corinne Mercier^a, Laurence Lecordier^a, Françoise Darcy^{a*}, Didier Deslee^a,
Avril Murray^a, Béatrice Tourvieille^a, Pierrette Maes^b,
André Capron^a and Marie-France Cesbron-Delauw^a

^aCentre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire, Unité mixte INSERM U 167/URA CNRS 624 and

^bLaboratoire de Chimie des Biomolécules URA CNRS 1309, Institut Pasteur de Lille, Lille, France

(Received 1 October 1992; accepted 4 November 1992)

The monoclonal antibody (mAb) TG17.179 recognizes an excreted-secreted antigen (ESA) of 28.5 kDa named Gra 2, which is stored in the dense granules of *Toxoplasma* cells and secreted into the parasitophorous vacuole after host cell invasion. Screening of an expression cDNA library with TG17.179 led to the isolation of several clones, the longest one (clone L) being of 1030 bp. Clone L cDNA was found to be homologous to a previously described composite cDNA encoding a P28 protein of *Toxoplasma gondii*. Characterization of one genomic clone indicates that the complete *GRA 2* gene is about 1.3 kb in length, including an intron of 241 bp. Northern blot and primer extension analyses confirmed the size of the mature messenger (1.1 kb). Amino acid partial sequencing of the native antigen purified by HPLC and metabolic radiolabelings of ESAs perfectly matched the primary amino acid structure deduced from the clone L cDNA. This primary translation product consists of an 185 amino acid polypeptide (19.8 kDa) including a 23 amino acid signal sequence. The presence of many serine and threonine residues may indicate an *O*-glycosylation. The predicted mature polypeptide shows an internal helical domain with 2 amphipathic α -helices. These might be involved in the association of Gra 2 with the membranous network within the parasitophorous vacuole.

Key words: *Toxoplasma gondii*; Excreted-secreted antigen; Dense granule; Gene structure

Introduction

In the search for protective antigens aiming

Correspondence address: C. Mercier, CIBP, INSERM U167, CNRS 624, Institut Pasteur, 1 rue du Professeur Calmette, 59019 Lille Cedex, France. Tel.: (33)20.87.78.00; Fax: (33)20.87.78.88.

**Present address:* INSERM U 298, Centre Hospitalier Régional d'Angers, Angers, France.

Note: Nucleotide sequence data reported in this paper have been submitted to the GenBank™ data base with the accession number L01753.

Abbreviations: ESA, excreted-secreted antigen; IFA, incomplete Freund's adjuvant; E/S, enzyme/substrate; mAb, monoclonal antibody.

at the development of a subunit vaccine against *Toxoplasma gondii*, several molecules have been found to represent good candidates, in particular Sag 1 [1,2]. This major surface antigen of 30 kDa is found specifically on the tachyzoite (the invasive form of the parasite) and has been recently shown by Bülow et al., Khan et al. [3,4] and Darcy et al. [43] to protect mice against lethal parasite challenge.

In contrast, previous work in our laboratory has highlighted the likely efficacy of tachyzoite excreted-secreted antigens (ESAs) as immunogens for a vaccine. Indeed, the secretion of ESAs into the parasitophorous vacuole that occurs after invasion suggests a role for these proteins in the survival of the parasite within the host-cell. In addition, they have been

reported to be immunogenic during human and experimental infections [5,6] and to protect highly susceptible nu/nu rats, inducing both antibody-dependent [6] and cellular [7,8] immune responses. Furthermore, some of these ESAs have been identified to share common epitopes with antigens of bradyzoites, which are the persisting forms of the parasite [9]. Such common antigens might provide a molecular basis for the mechanism of a concomitant immunity [10] and have thus been chosen in our laboratory as candidates for the development of a vaccine [9,11].

Various approaches have led us to the characterization of four antigens common to the tachyzoite and the bradyzoite stages [9,12,13]. Among them, a major component of the ESA fraction, named Gra 2, has been shown to be a glycosylated constituent of the matrix of tachyzoite dense granules and to be associated with the microvillus network of the parasitophorous vacuole after host invasion [9,12–14]. Serological studies have recently shown that this antigen contains at least 3 B-cell epitopes (Murray et al., in preparation); one of them, the C-terminal epitope, is recognized by the mAb TG17–179 [12] and is probably linear [15].

On the basis of partial cDNA sequences [15] and subcellular distribution, the Gra 2 antigen (first named GP 28.5) appears to be identical to the protective antigen of 28 kDa described by Sibley and Sharma [16–18], cloned by Prince et al. [19] and corrected by Parmley et al. [20].

In this report we describe the genomic organization of the gene including the intron-exon structure and the 5'- and 3'-flanking regions and discuss the features deduced from the peptide sequence in relation to data concerning the subcellular trafficking of the molecule.

Materials and Methods

Toxoplasma parasites

Tachyzoites were obtained from the peritoneal fluids of Swiss mice 3 days after infection

with the RH strain of *Toxoplasma gondii* [21]. Parasites were harvested in RPMI-1640 medium (Gibco BRL, Paisley, Scotland), filtered through 3 μm polycarbonate membranes (Nuclepore, Pleasanton, CA, USA) and washed twice in the same medium.

Production of mouse antibodies

The mAb TG17–179 was produced by immunizing BALB/c mice with ESAs as described previously [12].

In order to produce a monospecific antiserum, female OF1 mice (8–10 weeks old; IFFA CREDO, l'Arbresle, France) were immunized by subcutaneous injections, 4 times (7 days between each immunization) with 20 μg of the native Gra 2 antigen (purified by HPLC as described below) emulsified in 100 μl of IFA.

Preparation of T. gondii nucleic acids

Total RNA was isolated from *T. gondii* tachyzoites of the RH strain by the lithium/urea extraction method [22]. Poly(A)⁺ RNA was selected by oligo (dT)-cellulose chromatography using the Poly(A) QuickTM mRNA purification kit (Stratagene, La Jolla, CA, USA).

DNA of tachyzoites (RH strain) was separated from contaminating murine DNA by isopycnic density gradient ultracentrifugation in CsCl containing the fluorescent dye Hoechst 3358 as described by Johnson et al. [23].

Tachyzoite library construction

Construction of a tachyzoite cDNA expression library in the vector λZapII was performed, using the Zap cDNATM Synthesis Kit (Stratagene) and 5 μg of tachyzoite poly (A⁺) RNA template. The cDNAs were ligated into the 5' *EcoRI* and 3' *XhoI* sites of the polylinker within the *LacZ* gene of λZapII (Uni ZapTMXR, Stratagene). After in vitro packaging (GigapackTMII Gold Packaging Extract, Stratagene), the library consisted of approximately of 1×10^6 recombinant phages.

The construction of the *Toxoplasma* genomic library in EMBL3 after partial digestion of tachyzoite genomic DNA with *MboI* has been

previously described [13].

Library screening and sequencing

cDNA library screening and sequencing. The cDNA library was plated on *E. coli* XL1-Blue (Stratagene) and screened with the mAb TG17-179 (1/500) diluted in TBS (10 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl). Bound antibodies were detected with horseradish peroxidase (HRPO)-conjugated sheep anti-mouse IgG (Diagnostics Pasteur, Marnes-la-Coquette, France) diluted 1/500 in TBS. The coinfection of bacteria by selected recombinant λ ZapII and a helper phage (R408, Stratagene) leads to excision of the pBluescript phagemid containing the cloned cDNA inserts. Single-strand phagemid DNA produced in presence of the same helper phage was used directly to sequence the cDNA inserts by the dideoxy-chain termination method [24] (Multiwell Microtitre Plate DNA Sequencing System, Amersham, International plc, Amersham, UK).

Genomic library screening and sequencing.

The genomic library was plated on *E. coli* P2.392 and screened with a 5' cDNA restriction fragment of the L cDNA clone (22–205 *Eco*RI-*Sa*II fragment of 184 bp, see Fig. 1). The probe was radiolabeled using [α - 32 P]dCTP (Amersham) by the method of random hexadeoxyribonucleotide priming [25]. The hybridizations were carried out at 65°C, in a 5 \times Denhardt /6.6 \times SSC buffer (5 \times Denhardt is 0.1% BSA/ 0.1% polyvinylpyrrolidone/ 0.1% Ficoll (w/v); and 10 \times SSC is 1.5 M NaCl/ 0.15 M Na₃C₆H₅O₇ pH 7.2).

DNA restriction fragments were subcloned into M13 mp18 and M13 mp19. Deleted mutants generated by the Cyclone System (Cyclone I, Rapid Deletion Subcloning Biosystem for M13 Derivated, IBI, Eastman Kodak Company, Rochester, NY, USA) were sequenced by the Sanger method [24].

DNA sequences were analyzed using the DNA Star program (DNAstar Inc., Madison, WI, USA) and database searches were performed on the NBRF/PIR (36150 entries) and GenBank/EMBL (64020 entries) databases.

RNA analysis

A primer extension reaction was performed using a synthetic oligonucleotide corresponding to part of the 5' region of the cDNA (CM10: 5' CATTGTGAGGCGATATGTG-GAG 3') end-radiolabeled with [γ - 32 P]ATP (Amersham) and T4 polynucleotide kinase (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Germany). Total tachyzoite RNA and the labeled primer were coprecipitated, redissolved in a 80% formamide hybridization buffer (80% formamide/ 0.4 M NaCl/ 40 mM Pipes pH 6.7/ 1 mM EDTA pH 8), denatured by heating (10 min at 80°C) and hybridized overnight at 50°C. Primer extension was carried out for 2 h at 37°C using Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (MMLVRT Boehringer) in elongation buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.3/ 10 mM DTT/ 60 mM KCl/ 6 mM MgCl₂/ 3 mM dNTP/ 40U RNasein/ 40U MMLVRT). The labeled DNA was analyzed by electrophoresis on a 7 M urea/ 1 \times TBE (89 mM Tris-HCl/ 88 mM H₃BO₃/ 2 mM EDTA)/ 8% acrylamide sequencing gel (GIBCO BRL, Cergy-Pontoise, France).

Purification of Gra 2 by HPLC

1 \times 10¹⁰ RH strain tachyzoites were washed twice with 10 mM PBS, pH 7.2. After centrifugation at 1000 \times g for 10 min, the pellet was incubated overnight at 4°C with gentle agitation at a concentration of 10⁹ parasites ml⁻¹ in TEN buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.4/ 2 mM EDTA/ 150 mM NaCl) containing 1% NP40, 100 U ml⁻¹ aprotinin and 40 μ M PMSF. After centrifugation at 3500 \times g for 20 min, the supernatant was recovered and filtered through a 0.22- μ m Millipore membrane (Millipore Corp.). Nonidet P40 (NP40)-extracted tachyzoite proteins were subjected to reverse phase high pressure liquid chromatography (HPLC) on a Vydac C18 column (300 Å, 7 μ m particle size, column: 500 \times 9 mm). 8 ml of crude protein extract was loaded on the C18 column at 0% B (solvent A is 0.5% (v/v) trifluoroacetic acid (TFA) in water; solvent B is 25/75/0.45 (v/v) of water/ acetonitrile/TFA). After 10 min of isocratic elution, proteins were eluted with a gradient of

0–100% solvent B over a period of 180 min at a flow rate of 2 ml min^{-1} and detected by absorbance at 215 nm. To localize the Gra 2 antigen, each HPLC fraction was lyophilized (SMH15 lyophilizer, Usifroid, Maurepas, France) and the dried product was diluted in $100 \mu\text{l}$ (TEN/ 10 mM PBS pH 8 (v/v)). $1 \mu\text{l}$ of each fraction was tested by dot-blot using TG17–179 directed against Gra 2 as described [6]. $10 \mu\text{l}$ (i.e., about $12 \mu\text{g}$ of purified protein) of the fractions which gave positive reactions were controlled for purity by acrylamide gel electrophoresis in the presence of 2-mercaptoethanol (2-ME), according to Laemmli [26] and silver stained [27]. A similar electrophoresis gel was electroblotted onto a nitrocellulose membrane (Schleicher and Schuell, Dossel, Germany) as described by Towbin et al. [38]. The membrane was developed with the mAb TG17–179 and peroxidase-labeled anti-mouse IgG (H+L) (Diagnostics Pasteur). Positive fractions were pooled and the protein concentration was determined according to Peterson [29].

Protein analysis

Partial amino acid sequencing of Gra 2. The native Gra 2 purified by HPLC was submitted to a 13% SDS/PAGE and electroblotted onto a PolyVinylideneDiFluoride membrane (PVDF, Immobilon P, Millipore). 100 pmol of non-prestained β galactosidase (Sigma, Saint-Quentin-Fallavier, France) containing a free N-terminal amino acid was loaded onto the same gel. The Gra 2 and the β galactosidase bands were subjected to direct sequencing using the Edman degradation method [30] on an Applied Biosystems 470A Gas Phase Sequencer (Applied Biosystems, Paris, France). The phenylthioisocyanate amino acid derivatives were analyzed using an Applied Biosystems 120A RP-HPLC on-line system. Following this initial analysis, the Gra 2 band obtained after SDS/PAGE and electroblotting onto PVDF was subjected to tryptic cleavage for 2 days at 37°C (Trypsin Sequencing Grade, Boehringer) in E/S: 5/100 and in 100 mM Tris-HCl pH 8/ 10 mM CaCl_2 buffer, according to the procedure of Vandekerckhove

et al. [31]. Tryptic fragments were separated by reversed phase microbore HPLC (Aquapore C18; $7 \mu\text{m}$ particle size; 300 \AA ; $250 \times 1 \text{ mm}$). After 40 min of isocratic elution, the tryptic fragments were eluted with a first gradient of 0–37% solvent B over a period of 120 min followed by a second gradient of 37–80% solvent B over a period of 60 min, at a flow rate of $50 \mu\text{l.min}^{-1}$. This preparation allowed us to obtain 5 different peptides. They were sequenced on the same microsequencer as described above. The molecular mass of the isolated peptides was determined using a Bion-Ion 20, 252 Cf fission fragment ionization time of flight mass spectrometer (Applied Biosystems). A $5 \mu\text{l}$ aliquot (10% of the total volume) of peptide solution was loaded onto nitrocellulose backed aluminized foil. The spectrum was accumulated during 25×10^6 fission events (about 250 min).

Metabolic labeling of tachyzoite cultures. 1.5×10^8 tachyzoites for each assay were incubated at 37°C for 30 min under gentle agitation in RPMI medium (kit RPMI-1640 Select Amine, GIBCO BRL) without the amino acids to be used in labeling supplemented with 10% heat-inactivated rat serum previously dialyzed for 24 h against 10 mM PBS. Then, 9.25 MBq of [^3H]isoleucine (3.44 TBq mmol^{-1} ; Amersham) or 9.25 MBq of a amino acid mixture (L-[4,5- ^3H]leucine 5.51 TBq mmol^{-1} / L-[4,5- ^3H]lysine 3.33 TBq mmol^{-1} / L-[2,3,4,5,6- ^3H]phenylalanine 5.0 TBq mmol^{-1} / L-[2,3,4,5- ^3H]proline 3.56 TBq mmol^{-1} / L-[2,3,4,5,6- ^3H]tyrosine 3.85 TBq mmol^{-1} ; Amersham) were added to each test tube. Pulse-chase assays and the immunoprecipitation of labeled ESAs were performed as described [6].

Results

Isolation and sequencing of the gene encoding Gra 2. The isolation of partial length cDNA GRA 2 clones has been previously described [15]. Longer cDNAs were obtained after screening a cDNA library constructed in the

AAAAACAGTTCGTCGCAAAAGGTTAATTACCTACGCACCACGAAGAAAACGCGTATCACGTCAGTCCCTTA -254
 CGGTCAATATACAAATACTTGGGCCGTCCAGTGGAGGCAACGTGCCCGTCGCACGGTGATACTGACTGGTGA -182
 CTTGCACGTACGTCTCTCGCCGGCGTCCAAACCAATTGACCCGGGGCAGCCTACTCCCTGTGCTGCCCTTAG -110
 GCTAAGTGGAGCAACATCTCTACACAGAGACGACGCCAGAGAGCGCAAAATGAACAGCGGAACCTGCGTCGC -38
 TGCTGTCTCGCAACTGATGACAGAAAGGGTCATTAACGATTTCTTTGCAATTCGCGTCGTTATCGCAC 35
 GTTGTCTCTCTCCACGAATAGTGTGTTTATTAGATATTGCTTCTTCTCCACATATCGCCTCACAATGTT 107
 CM 10 M F 2
 CGCCGTAAACATTGTTTGGTGGTGTGCGGTTGGCGCCCTGGTCAACGTCTCGGTGAGGGCTGCCGAGTT 179
 A V K H C L L V V A V G A L V N V S V R A E F 26
 TTCGGAGTTGTTAACAGGACCAGTCCGACGTGCCTTTTACGGGTAACCTTTGATGAGAGAGCAGTTGG 251
 S G V V N Q G P V D V P F S G K P L D E R A V G 50
 (GTAAGTTGGCAAAAGTAATGATAGAGGACGGGTTGAACGATAGCGGCTGCAGATTTGTATAACACAACAT 323
 GATGTAGCTGCCACGGTTTTTTTTTCGGAGAGTGTGCCGTCGACTGTTTCATCGCACCCATGGGAGCTAGGG 395
 AGGTGCGCTTTCTGTGTGATATGTATTGCTCTAGTCCAATTTCCACGCACCTGTAGTGTCTTGAGACTCGGT 467
 GCCATGTAGAATTTTGTGTCTGCAAGGAAAAGGTGAACATACACCACCCTCCAGACGAGAGCAACAAG 539
 G K G E H T P P L P D E R Q Q 65
 AGCCAGAAGAACCGGTTTCCCAACGTGCATCCAGAGTGGCAGAACACTGTTTCGCAAGTCTTTGAAGTTCC 611
 E P E E P V S Q R A S R V A E Q L F R K F L K F 89
 CTGAAAACGTCCGACATCACAGTGAAGGCCCTTCAAAAAGCAAAGGTGGTGGCAGAAAAGGCTTCACCG 683
 A E N V G H H S E K A F K K A K V V A E K G F T 113
 CGGCAAAAACGCACACGGTTAGGGGTTTCAAGGTGGCCAAAGAAGCAGCTGGAAGGGGCATGGTGACCGTTG 755
 A A K T H T V R G F K V A K E A A G R G M V T V 137
 GCAAGAACTCGCAATGTGGAGAGTGACAGAAAGCACTACGACAACGCAGGCCCGGACAGCCCTAATGGCC 827
 G K K L A N V E S D R S T T T T Q A P D S P N G 161
 TGGCAGAAACCGAGGTTCCAGTGGAGCCCCAACAGCGGGCCGACACGTCGCCGTCACAGACTTTTCCGAGT 899
 L A E T E V P V E P Q Q R A A H V P V P D F S Q 185
 AATGTTGACTACGACGAAAGTGTGCGCAGGCTGGAAGCCGCTGAAGGGAGAAGTCTACAAGCCGATCAG 971
 *
 TGA AAAATGTGTGGGAGGTGGTCTTGTGTCAGGAATGCAATGGTGTAAAGCATCGTGTTCGAATGCAGTGC 1043
 GTGTATCAGTTGTGCGCGGAAGGACACTGCTTCAATGTTAAGAACCTGTTTTCTCCGTAGAGAGGACCAAAA 1115
 GACGATTGCAAACTGGTATGTACGCAATAGCCCAATGCCGGACGTCAGTTGGTTGTATGTGACGCTCCGAG 1187
 ATGTCATATGCCCTGTGAGTGTGCTGGGATGCAAGTTTTTGGTGTGCGTTGATTCGCCACGCTTATGACAG 1259
 TGGCAGACGAATTATTGACATGATACAAGGACGAGAAAGGAACAAACACCGTAGTTCCAGTCGAC 1325
 *

Fig. 1. Sequence of the *GRA 2* gene and its surrounding regions. The sense strand of the *GRA 2* gene is shown with the major and minor transcriptional sites indicated with bold and light arrows respectively. GC-rich regions are dotted-underlined. * indicates the putative polyadenylation addition site in the cDNA clones. Arrowhead indicates the 5' end of the L cDNA clone. The CM10 primer used for the primer extension reaction is double-underlined. The limits of the intron are between parentheses. The amino acid sequence of the single open reading frame is shown below the DNA sequence. Open arrowhead indicates the site of cleavage of the putative leader sequence. The 5 peptides obtained by microsequencing tryptic fragments of the HPLC purified Gra 2 are underlined.

λ ZapII expression vector with TG17-179, which is directed against the C-terminal epitope of Gra 2 [12,15]. The longest cDNA clone obtained (1030 bp, Fig. 1) was named L and was directly sequenced in its pBluescript phagemid form. Sequence analysis indicated

perfect homology with the P28 cDNA sequence described by Prince et al. [19] and revised by Parmley et al. [20]; clone L also contained the 3' untranslated sequence of the *GRA 2* gene, including the site of poly (A) tail addition. Since no longer cDNA clones were

isolated even after hybridization screenings using a most 5' region of the cDNA as a probe (22–205 *EcoRI*-*SalI* insert; Fig. 1), an EMBL3 genomic tachyzoite library was screened with the same 184-bp cDNA probe in order to verify that we had obtained the entire 5' nucleotidic sequence of *GRA 2*. A 5-kb fragment of the *Gra 2*-EMBL3 genomic clone that was isolated and a 2040-bp sub-clone derived from it were subcloned into pUC19.

Analysis of the GRA 2 gene structure and predicted protein sequence. The complete sequence of the *GRA 2* gene, including 5'- and 3'-flanking regions is shown in figure 1. To determine the genomic organization of the *GRA 2* gene, the genomic sequence was compared with that of the clone L cDNA. This analysis showed that the *GRA 2* gene consists of two exons separated by a 241-bp intron whose existence was verified by an SI nuclease protection assay performed with the 5-kb genomic *HindIII*-*HindIII* fragment and poly(A)⁻ tachyzoite RNA (data not shown). The 5'- and 3'- splice junctions of the intron showed high homology with the consensus boundary sequence (Fig. 1).

Comparison of *GRA 2* genomic sequence with that of Parmley et al. [20] reveals two (minor) differences in the untranslated regions, most probably due to differences between the strains used by the two laboratories. The first difference is located within the accepting junction of the intron, where the additional bases 'CTGC' are found in the Parmley et al. sequence. The second one consists in the addition of 'GAGAAG' bases at position 948 within the 3' non-coding region of our sequence.

Southern blot analysis of tachyzoite (RH strain) genomic DNA hybridized with the clone L cDNA probe indicated that the *GRA 2* gene is probably unique in the *Toxoplasma* genome (data not shown).

Northern blot analysis performed with total RNA of tachyzoites (RH strain) hybridized with the clone L probe revealed one population of mRNA encoding the *Gra 2* protein (data not shown). The size of the mRNA was

estimated to be approximately 1100 bp, corresponding to the size of the clone L cDNA insert. To define more precisely the transcription start site we performed primer extension (Fig. 2) with total RNA of tachyzoites (RH strain) primed with an oligonucleotide (CM10) that extends from positions 105–84 (Fig. 1). By using a sequencing reaction primed with the same oligonucleotide as marker, three different potential start sites were localized and were marked as +1 on the

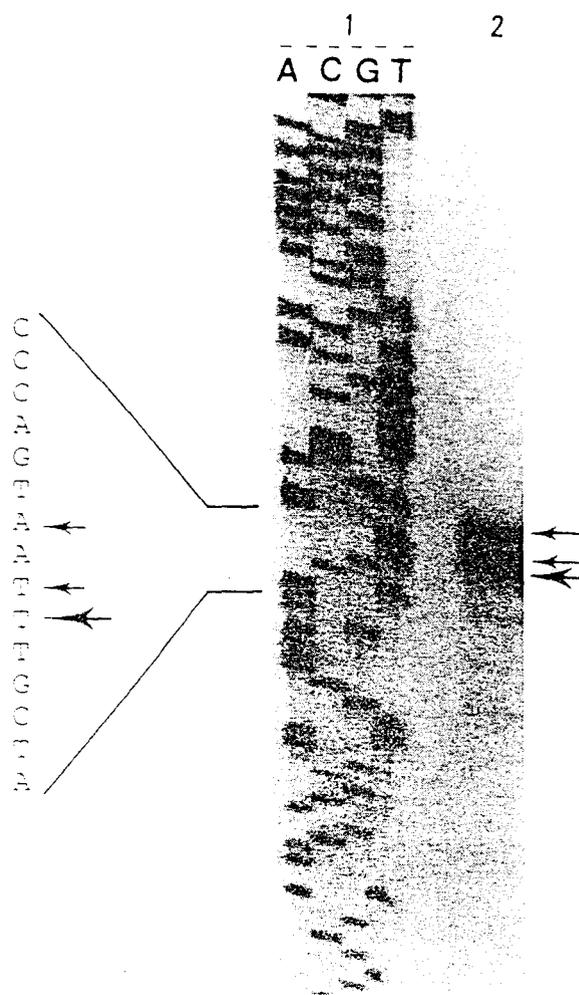


Fig. 2. Primer extension. 10 µg of total tachyzoite RNA were hybridized with an antisense primer (CM10, lane 2), designed to hybridize to nucleotides (105–84) in the DNA sequence shown in Fig. 1. The same primer was used to generate a dideoxy sequencing ladder (A,C,G,T) on lane 1, which permitted the determination of the size of the extension products.

sequence (Fig. 1). The lower band appears to be the major transcription start site whereas the two upper bands appear to represent minor ones, as judged from the relative intensity of the bands (Fig. 2).

The single ORF deduced from the nucleotide sequence presents a methionine start codon 103 bp downstream of the major transcription start site and a stop codon TAA in position 899 (Fig. 1). This ORF potentially encodes a protein of 185 amino acids with a predicted molecular weight of 19.8 kDa. The putative translation start codon is found in a favored context (tCACaATGt) as shown by Kozak (CCPuCCATGG) [32] in higher eukaryotes and Ossario et al. [33] in the case of *T. gondii*. This ORF is followed at its 3' end by an untranslated sequence of 392 bp before the polyadenylation tail.

The first 23 amino acids of the deduced cDNA sequence display the typical features for a signal peptide targeting the protein to the secretory pathway. According to the values published by Von Heijne [34], the most probable cleavage site was found between Ala 23 and Ala 24 (Fig. 1). The mature polypeptide would thus consist of 162 amino acids, corresponding to a molecular weight of 17.4 kDa.

Prediction of the secondary structure of the Gra 2 cDNA deduced sequence [35] indicates that a considerable fraction of the polypeptide (56%) and particularly, the hydrophobic segment defined between positions 69 and 144 (Fig. 1) may exist in an α -helical conformation (Fig. 3A). The amino acids of the 69–87 portion could be arranged in an amphipathic α -helix of 19 residues in which hydrophobic and hydrophilic residues would define a hydrophobic and a hydrophilic surface respectively (Fig. 3A). The hydrophilic surface would be globally positively charged, except for two negatively charged glutamic acid residues. The same features are observed for the 98–116 amino acid portion which presents a repeated pattern of 45% homology with the first defined α -helix (Fig. 3A, 3B) [36]. The two helices would then be separated by a 10-amino acid linker.

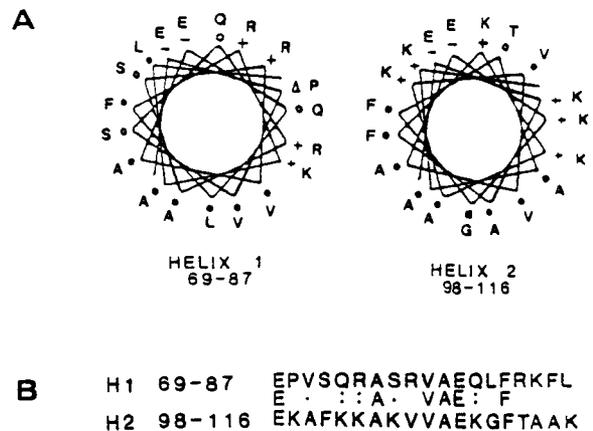


Fig. 3. Characteristics of the primary and secondary amino acid structures deduced from the *GRA 2* cDNA sequence. (A) Amino acid sequence of the α -helical 69–116 region as Edmonson helical wheels. Δ , proline; +, basic; -, acidic; \bullet , hydrophobic; \square , glycine; \circ , others. Numbers in parentheses indicate the position in the amino acid primary sequence (Fig. 1). (B) Alignment of the 69–97 region with the 98–116 one by the standard method of Needleman and Wunsch [35].

Biochemical characterization of the native Gra 2 antigen. The Gra 2 antigen was purified by HPLC from NP40-extracted tachyzoites: fractions eluted from the column that reacted on dot blots with TG17–179 were selected (data not shown). The purity of these fractions was shown by silver staining SDS/PAGE; two components were separated, a major one of 28.5 kDa (Gra 2) and a minor contaminating one of 56 kDa (Fig. 4A). Their immunoreactivity with TG17–179 was judged by immunoblot. The 56-kDa upper band is not recognized (Fig. 4B). After electroblotting of the HPLC fraction onto a PVDF membrane, the 28.5-kDa band was cut and microsequenced by the Edman degradation method [30]. No N-terminal sequence could be obtained from the native protein, suggesting that the N-terminal amino acid might be blocked. Tryptic cleavage of the Gra 2 antigen followed by HPLC allowed the separation of 5 different peptides; these peptides were analyzed by gas phase microsequencing and plasma desorption (Table I). The 5 sequences obtained matched with the corresponding peptide regions predicted from the cDNA (Fig. 1). The peptide with sequence AVGGK was particularly interesting

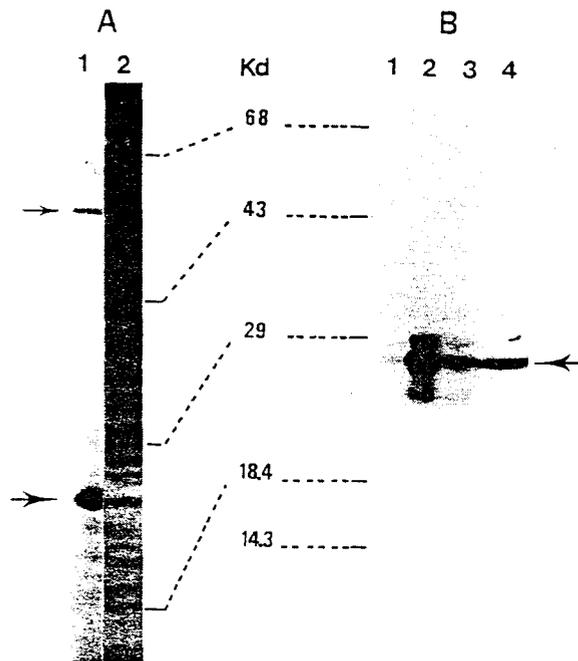


Fig. 4. Purification of Gra 2 by HPLC. (A) After purification by HPLC, fractions containing Gra 2 were analyzed by 13% SDS/PAGE under reducing conditions and silver stained. As control, a fraction of the NP40-tachyzoite preparation, which was used for HPLC, was loaded onto the same gel. Lane 1, 8 μ l of a representative HPLC fraction (corresponding to 12 μ g of purified protein). Lane 2, 20 μ l (corresponding to 2×10^7 tachyzoites) of a representative NP40-tachyzoite preparation. (B) Reactivity of TG17-179 against the purified protein. Samples of the HPLC fractions were submitted to 13% SDS/PAGE, electroblotted onto nitrocellulose and probed with TG17-179. Antibody reactivity was then visualized using a peroxidase-labeled anti-mouse IgG conjugate. Lane 1, HPLC fraction (X+1). Lane 2, HPLC fraction (X) corresponding to the Gra 2 peak. Lane 3, HPLC fraction (X-1). Lane 4, 20 μ l of the NP40-tachyzoite preparation used for the HPLC. The migration of molecular weight standards (Gibco BRL) is shown (kDa) between the two parts of the figure.

because it confirmed the splice junctions of the intron (Fig. 1).

In addition, [3 H]isoleucine metabolically-labeled ESAs were immunoprecipitated with a mouse anti-Gra 2 antiserum directed against HPLC purified Gra 2 protein. No band of 28.5 kDa was detected even after 3 weeks of exposure (Fig. 5, lane 4), strongly suggesting that no isoleucine residues are contained in the Gra 2 protein whereas 3 isoleucines are found in the 67 N-terminal amino acids deduced from

TABLE I

Sequence analysis and molecular mass determination of tryptic peptides derived from native Gra 2 antigen purified by HPLC

Tryptic fragments sequenced and their position in the amino acid sequence (Fig. 1)	Experimental mass	Theoretical mass (M+H) $^{-1}$
Peptide 48-52 <u>AVGGK</u>	-	431.2
Peptide 53-63 <u>GEHTPPLPDER</u>	1246.6	1247.4
Peptide 64-73 <u>QQEPEEPVSOR</u>	-	1326.4
Peptide 89-99 <u>FAENVGHHSEK</u>	1258.1	1254.4
Peptide 175-185 <u>AAHVVPDFSQ</u>	1168.4	1167.4

Peptides are indicated by their position in the amino acid sequence (Fig. 1). Peptide sequences identified by gas phase microsequencing are underlined. The experimental mass obtained by plasma desorption mass spectrometry is compared to the theoretical mass calculated of the amino acids determined from the Gra 2 cDNA sequence. The plasma desorption spectrum of peptide 48-52 shows that a peak corresponding to a mass of 431.2 is localized in the area where nitrocellulose background is high: as a consequence, the experimental mass of a peptide whose molecular weight is lower than 500 could not be determined. Experimental and theoretical masses of peptides 53-63 and 175-185 are nearly identical. Peptide 64-73 was not desorbed from the nitrocellulose membrane: no experimental mass was detected. The difference of 3.7 observed between experimental and theoretical masses of peptides 89-99 has not been explained. - indicates that the experimental mass could not be obtained.

the P28 sequence [19]. No higher molecular weight band was seen either, although the 65-kDa component present in the HPLC fraction (Fig. 4A) was coinjected to produce the anti-Gra 2 antiserum. As positive controls, [3 H]isoleucine-radiolabeled ESAs were immunoprecipitated by the anti-Gra 1 mAb TG17-43 (Fig. 5, lane 5) [2,13] whereas the pellet containing membrane derivatives was immunoprecipitated with the anti-Sag 1 mAb TG54 (Fig. 5, lane 6) [2-3, 37]. Gra 1, the first cloned secreted antigen of dense granules and Sag 1, the major surface antigen of *T. gondii* contain 9 and 16 isoleucine residues respectively. Strong bands of 23 and 30 kDa corresponding to, respectively, Gra 1 and Sag 1 were seen after one week of exposure. Furthermore, immunoprecipitation with anti-Gra 2 antiserum after labeling with a mixture of tritiated radiolabeled

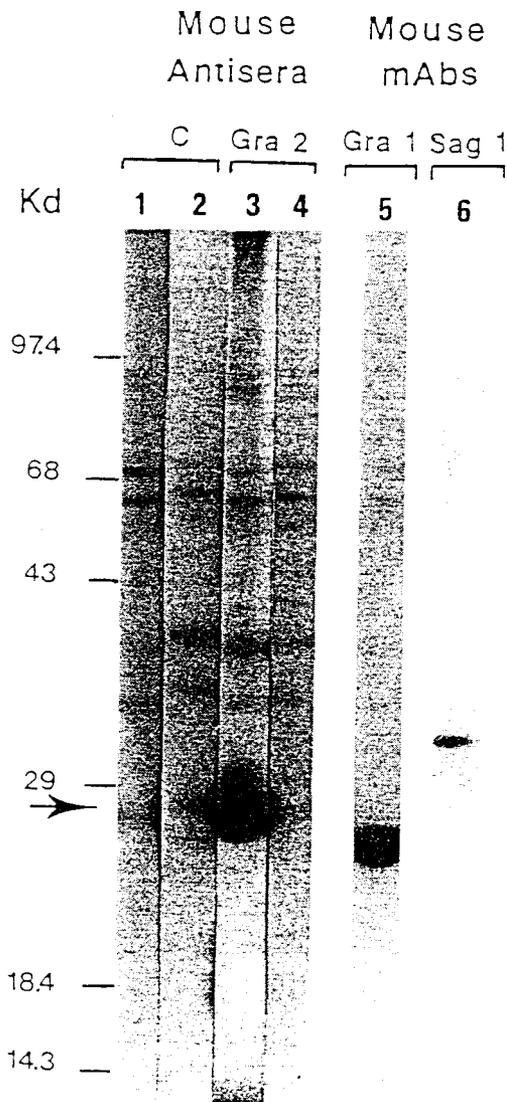


Fig. 5. Immunoprecipitation of [3 H]isoleucine or of a mixture of 5 [3 H]-labeled amino acids (leucine, lysine, phenylalanine, proline and tyrosine)-labeled ESAs. Five [3 H]amino acids (lanes 1, 3) labeled ESAs and [3 H]isoleucine (lanes 2, 4, 5, 6) were immunoprecipitated using several different mouse antisera or monoclonal antibodies and separated by SDS/PAGE (13% acrylamide). The gels were calibrated on the left by molecular weight standards (Gibco BRL) and exposed for variable time at -70°C with Kodak X Omat AR film (Eastman Kodak Company, Rochester, NY, USA). "C": serum of mice immunized with the IFA alone, as negative control of "Gra 2" (exposure time: 3 weeks); "Gra 2": serum of mice immunized with Gra 2 purified by HPLC (exposure time: 3 weeks); "Gra 1": mAb TG17-43 directed against the Gra 1 antigen [2,12] (exposure time: 1 week); "Sag 1": mAb TG54 directed against the Sag 1 antigen [1,2,37] (exposure time: 1 week).

amino acids showed that the Gra 2 native antigen can be effectively ^3H -radiolabeled and immunoprecipitated by the antiserum used in this experiment (Fig. 5, lane 3).

Discussion

The 28.5-kDa antigen appears to be one of the major components involved in ESAs-induced immunity. Preliminary results in mice immunized with HPLC purified GP28.5 antigen have shown 70% protection against a lethal oral challenge with cysts of the *T. gondii* 76K strain [38, Cesbron-Delauw et al., unpublished data). In addition, immunogold staining with TG17-179 has shown that the GP28.5 antigen is part of the dense granule components and is secreted into the parasitophorous vacuole after invasion, where it is detected closely associated with the membranous network [12,14].

Antibody screening with TG17.179 allowed the isolation of cDNA clones encoding the C-terminal region of the 28.5-kDa antigen, including the 3' non-coding region and the poly(A) tail [19]. Sequence analysis revealed that they correspond to the cDNA sequence encoding the P28 protein previously described by Prince et al. [19], corrected by Parmley et al. [20] and further named Gra 2 according to the nomenclature proposed by Sibley et al. [2].

The *GRA 2* gene consists of two exons, a 5' exon of 251 bp and a 3' exon of 801 bp. The two exons are separated by an intron of 241 bp. No TATA-box nor CAAT-box were found in the 5'-flanking region, but GC-rich sequences which could serve as signals for the transcription start site were found in the 230-bp region upstream of the cap site (Fig. 1). The same observation has been reported both by Cesbron-Delauw et al. [13] for the *GRA 1* (P23) and by Lecordier et al. (Lecordier et al., in preparation) for the *GRA 5* (P21) genes. Because these 3 genes (*GRA 1*, *GRA 2* and *GRA 5*) encode 3 dense granule antigens that are secreted by *T. gondii* after host cell invasion, these genes might be under similar transcriptional regulation. Another common

feature between the *GRA 2*, the *GRA 1* and the *GRA 5* genes (as well as for the α and β tubulin genes) [39] is that the ATG initiation codon is preceded by a 5' leader sequence characterized by T stretches (Fig. 1), the role of which (if any) in the *T. gondii* translation regulation remains to be defined. The stop codon is followed by an untranslated 3' region of 392 bp.

The primary translation product deduced from the *GRA 2* cDNA is a polypeptide of 185 amino acids (19.8 kDa) which would be matured in a 162-amino acid polypeptide after cleavage of the first 23-amino acid signal peptide. This constitutes another common feature with the *GRA 1* [23, 13] and the *GRA 5* (ref. 12, and Lecordier et al., in preparation) sequences, which both display a secretory signal sequence probably important in their intracellular trafficking [12–13].

The analysis of the Gra 2 amino acid sequence provides many interesting pieces of information about its maturation, folding and targeting. Post-translational modification of the Gra 2 mature polypeptide is suggested by previous studies which have reported GP28.5 binding to concanavalin A [6,12], the incorporation of [³H]glucosamine into native Gra 2 [14], and the association of GP28.5 with the Golgi apparatus [16]. No *N*-glycosylation site would be predicted from the analysis of the mature polypeptide deduced from the *GRA 2* cDNA, but the presence of many serine and threonine residues in the sequence might provide site(s) for *O*-glycosylation.

The association of Gra 2 with membranous structures has previously been reported [12,18,40]. In addition, Sibley and Boothroyd reported the Ca²⁺-regulated secretion of the Gra 2 protein in both soluble and membranous forms (Sibley L.D. and J.C. Boothroyd. 1992. Calcium regulated secretion and modification of host cell endocytic compartments by *Toxoplasma*. Abstract in J. Cell. Biochem. Suppl. 16A: 163). A large α -helical domain is predicted as secondary structure in the central part of Gra 2. The hydrophobic and hydrophilic residues of the 69–144 region could be separated into two repeated domains arranged

as two amphipathic α -helices (Fig. 3A and B). The length of the helices (19 residues) would be sufficient to ensure transmembrane spanning domains. As a consequence, in the condition of (homo or hetero) polymerization of Gra 2, the association of the two transmembrane domains linked by 10 amino acids could form a pore through the phospholipid bilayer.

Alternatively, the two amphipathic α -helices could be arranged in an antiparallel framework in which the hydrophobic surfaces would be buried inside the molecule while hydrophilic residues would be located on the surface. The positive charges of the hydrophilic surface of the helices would thus ensure an electrostatic binding of Gra 2 to the membranes. Such association with membranes is observed for amphitropic proteins which are soluble in water and interact with phospholipids of membranes in a calcium dependent manner [41]. Some amphitropic proteins are reported to interact with E.F.-hand proteins [42], suggesting that Gra 2 would perhaps interact with Gra 1, a Ca²⁺-binding protein of dense granules [13] that has been reported to undergo the same trafficking as Gra 2 in infected cells [12,13]. Gra 1 may thus function as a calcium buffer to stabilize the interaction of Gra 2 with membranous structures.

In conclusion, although the exact role of Gra 2 in parasite-host cell interactions remains to be determined, the molecular characterization of Gra 2 had allowed us to formulate several hypotheses concerning the targeting of the protein and to propose a functional (Ca²⁺-dependent) association between Gra 2 and Gra 1, the two major secreted molecules of *Toxoplasma* dense granules. Further experiments are thus in progress investigating the cellular interaction between Gra 2 and Gra 1.

Because the preliminary results of protection observed with the Gra 2 native protein tend to confirm the results previously described by Sibley and Sharma for the F3G3 antigen that contains both the P28 and a 58-kDa component [18], the protective effect against infection by *Toxoplasma* of immunizations with the Gra 2 protein, both recombinant and HPLC-purified, will be tested.

Acknowledgements

The authors thank Dr. B. Guy (Transgene, Strasbourg, France) for providing the tachyzoite genomic library. They are grateful to Prof. A. Tartar and to Drs. R. Lafyatis, C. Locht, A. McNair and C. Verwaerde for critically reading the manuscript and helpful discussions, Dr. J.P. Kusnierz for oligonucleotide synthesis and H. Caron for parasite production. They also acknowledge M.P. Fourmaux for excellent technical assistance and C. Drolez for iconography.

This work was funded by INSERM U167, CNRS URA 624, CNRS URA 1309 and Institut Pasteur de Lille. C. Mercier was supported by a grant from the French Ministry for Research and Technology.

References

- Burg, J.L., Perelman, D., Kasper, L., Ware, P.L. and Boothroyd, J.C. (1988) Molecular analysis of the gene encoding the major surface antigen of *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* 141, 3584-3591.
- Sibley, L.D., Pfefferkorn, E.R. and Boothroyd, J.C. (1991) Proposal for a uniform genetic nomenclature in *Toxoplasma gondii*. *Parasitol. Today*, 7, 327-328.
- Bülow, R. and Boothroyd, J.C. (1991) Protection of mice from fatal *Toxoplasma gondii* infection by immunization with P30 antigen in liposomes. *J. Immunol.* 147, 3496-3500.
- Khan, I.A., Ely, K.H. and Kasper L.H. (1991) A purified parasite antigen (P30) mediates CD8⁺ T cell immunity against fatal *Toxoplasma gondii* infection in mice. *J. Immunol.* 147, 3501-3506.
- Decoster, A., Darcy, F. and Capron, A. (1988) Recognition of *Toxoplasma gondii*-excreted and secreted antigens by human sera from acquired and congenital toxoplasmosis: identification of markers of acute and chronic infection. *Clin. Exp. Immunol.* 73, 376-382.
- Darcy, F., Deslée, D., Santoro, F., Charif, H., Auriault, C., Decoster, A., Duquesne, V. and Capron, A. (1988) Induction of a protective antibody-dependent response against toxoplasmosis by in vitro excreted-secreted antigens from tachyzoites of *Toxoplasma gondii*. *Parasite Immunol.* 10, 553-567.
- Ridel, P.R., Auriault, C., Darcy, F., Pierce, R.J., Leite, P., Santoro, F., Neyrinck, J.L., Kusnierz, J.P. and Capron, A. (1988) Protective role of IgE in immunocompromised rat toxoplasmosis. *J. Immunol.* 141, 978-983.
- Duquesne, V., Auriault, C., Darcy, F., Decavel, J.P. and Capron, A. (1990) Protection of nude rats against *Toxoplasma* infection by excreted-secreted antigens (ESA) specific helper T cells. *Infect. Immun.* 58, 2120-2126.
- Darcy, F., Charif, H., Caron, H., Deslée, D., Pierce, R.J., Cesbron-Delauw, M.F., Decoster, A. and Capron, A. (1990) Identification and biochemical characterization of antigens of tachyzoites and bradyzoites of *Toxoplasma gondii* with cross-reactive epitopes. *Parasitol. Res.* 76, 473-478.
- Capron, A. and Dessaint, J.P. (1988) Vaccination against parasitic diseases: some alternative concepts for the definition of protective antigens. *Ann. Inst. Pasteur/Immunol.* 139, 109-117.
- Darcy, F., Torpier, G., Cesbron-Delauw, M.F., Decoster, A. and Capron A. (1992) Diagnostic et prévention de la toxoplasmose: nouvelles approches et perspectives. *Gynéc. Intern.* 1, 48-57.
- Charif, H., Darcy, F., Torpier, G., Cesbron-Delauw, M.F. and Capron, A. (1990) *Toxoplasma gondii*: characterization and localization of antigens secreted from tachyzoites. *Exp. Parasitol.* 71, 114-124.
- Cesbron-Delauw, M.F., Guy, B., Torpier, G., Pierce, R.J., Lenzen, G., Cesbron, J.Y., Charif, H., Lepage, P., Darcy, F., Lecocq, J.P. and Capron, A. (1989) Molecular characterization of a 23-kDa major antigen secreted by *Toxoplasma gondii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 7537-7541.
- Achbarou, A., Mercereau-Puijalon, O., Sadak, A., Fortier, B., Leriche, M.A., Camus, D. and Dubremetz, J.F. (1991) Differential targeting of dense granule proteins in the parasitophorous vacuole of *Toxoplasma gondii*. *Parasitology* 103, 321-329.
- Cesbron-Delauw, M.F., Boutillon, C., Mercier, C., Fourmaux, M.P., Murray, A., Miquey, F., Tartar, A. and Capron, A. (1992) Amino acid sequence requirements for the epitope recognized by a monoclonal antibody reacting with the secreted antigen GP28.5 of *Toxoplasma gondii*. *Mol. Chem.* 29, 1375-1382.
- Sharma, S.D., Araujo, F.G. and Remington, J.S. (1984) *Toxoplasma* antigen isolated by affinity chromatography with monoclonal antibody protects mice against lethal infection with *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* 133, 2818-2820.
- Handman, E. and Remington, J.S. (1980) Serological and immunological characterization of monoclonal antibodies to *Toxoplasma gondii*. *Immunology*, 40, 579-588.
- Sibley, L.D. and Sharma, S.D. (1987) Ultrastructural localization of an intracellular *Toxoplasma* protein that induces protection in mice. *Infect. Immun.* 55, 2137-2141.
- Prince, J.B., Araujo, F.G., Remington, J.S., Burg, L., Boothroyd, J.C. and Sharma, S.D. (1989) Cloning of cDNAs encoding a 28 kilodalton antigen of *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 34, 3-14.
- Parmley, S.F., Sgarlato, G.D. and Remington, J.S. (1993) Genomic and corrected cDNA sequence of the P28 gene from *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 57, 163-168.
- Sabin, A.B. (1941) Toxoplasmic encephalitis in children. *J. Am. Med. Assoc.* 116, 801-807.
- Auffray, C. and Rougeon, F. (1980) Purification of mouse immunoglobulin heavy-chain messenger RNAs from total myeloma tumor RNA. *Eur. J. Biochem.* 107, 303-307.
- Johnson, A.M., Dubey, J.P. and Dame, J.B. (1986) Purification and characterization of *Toxoplasma gondii*

- tachyzoite DNA. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 64, 351-355.
- 24 Sanger, F., Nicklens, S. and Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74, 5463-5467.
 - 25 Feinberg, A.P. and Vogelstein, B. (1984) Addendum: a technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specificity. *Anal. Biochem.* 137, 266-267.
 - 26 Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227, 680-685.
 - 27 Sambrook J., Fritsch, E.F.T. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual.* 2nd edn., pp. 18.56-18.57. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
 - 28 Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76, 4350-4354.
 - 29 Peterson, G.L. (1977) A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal. Biochem.* 83, 346-356.
 - 30 Edman, P. and Begg, G., (1967) A protein sequenator. *Eur. J. Biochem.* 1, 80-91.
 - 31 Vandekerckhove, J., Bauw, G., Puype, M., Van Damme, J. and Van Montagu, M. (1985) Protein-blotting on polybrene-coated glass-fiber sheets. A basis for acid hydrolysis and gas-phase sequencing of picomole quantities of protein previously separated on sodium dodecyl sulfate/polyacrylamide gel. *Eur. J. Biochem.* 152, 9-19.
 - 32 Kozak, M. (1984) Compilation and analysis of sequences upstream from the translational start site in eukaryotic mRNAs. *Nucleic Acids Res.* 12, 857-872.
 - 33 Ossorio, P.N, Schwartzman, J.D. and Boothroyd, J.C. (1992) A *Toxoplasma gondii* rhostry protein associated with host cell penetration has unusual charge asymetry. *Mol. Biochem. Parasitol.* 50, 1-16.
 - 34 Von Heijne G. (1986) A new method for predicted signal sequence cleavage sites. *Nucleic Acids Res.* 14, 4683-4690.
 - 35 Garnier, J., Osguthorne, D.J. and Robson, B. (1978) Analysis of the accuracy and implications of simple methods for predicting the secondary structure of globular proteins. *J. Mol. Biol.* 120, 97-120.
 - 36 Needleman, S.B. and Wunsch, C.D. (1970) A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. *J. Mol. Biol.* 48, 443-453.
 - 37 Santoro, F., Afchain, D., Pierce, R.J., Cesbron, J.Y., Ovlaque, G. and Capron, A. (1985) Serodiagnosis of *Toxoplasma* infection using a purified parasite protein (P30). *Clin. Exp. Immunol.* 62, 262-269.
 - 38 Laugier, M. and Quilici, M. (1970) Intéret expérimental d'une souche de toxoplasmes peu pathogène pour la souris. *Ann. Parasitol. Hum. Comp. (Paris)* 45, 389-403.
 - 39 Nagel, S.D. and Boothroyd, J.C. (1988) The α - and β -tubulins of *Toxoplasma gondii* are encoded by simple copy genes containing multiple introns. *Mol. Biochem. Parasitol.* 29, 261-273.
 - 40 Leriche, M.A. and Dubremetz, J.F. (1991) Characterization of the protein contents of rhostry and dense granules of *Toxoplasma gondii* tachyzoites by subcellular fractionation and monoclonal antibodies. *Mol. Biochem. Parasitol.* 45, 249-260.
 - 41 Burn, B. (1988) Amphitropic proteins: a new class of membrane proteins. *Trends Biochem. Sci.* 13, 79-83.
 - 42 Gerke, V. (1991) p11, a member of the S-100 family, is associated with the tyrosine kinase substrate p36 (annexin II). In: *Novel calcium binding proteins. Fundamentals and Clinical Implications* (Heizmann, C. W., ed.), pp 139-155. Springer Verlag, Berlin.
 - 43 Darcy, F., Maes, P., Gras-Mass, H., Auriault, C., Bossus, M., Deslée, D., Godard, I., Cesbron-Delauw, M.F., Tartar, A. and Capron, A. (1992) Protection of mice and nude rats against toxoplasmosis by a multiple antigenic peptide construction derived from *Toxoplasma gondii* P30 antigen. *J. Immunol.* 149, 3636-3641.

II- ETUDE DE L'IMMUNOGENICITE ET DE L'ANTIGENICITE DES POLYPEPTIDES GRA1 ET GRA2 RECOMBINANTS

- p. 82 : *Molecular Immunology*, (1992) **29** : 1375-1382
- résultats non publiés
- p. 90 : *Applied Parasitology* (1993), **34** : 235-244

La purification de la molécule GRA2 (ou P28) par HPLC en phase inverse à partir d'un extrait de tachyzoïtes (coll. Dr. P. Maes, CNRS URA 1309) a permis de montrer le rôle potentiellement protecteur de cet antigène de sécrétion. En effet, l'immunisation de souris suivie d'une infestation orale et létale par 1200 kystes de la souche 76K (Laugier and Quilici, 1970), entraîne une protection qui se traduit par un pourcentage de survie de 75% environ, 100 jours après l'infestation (Cesbron-Delauw et col., résultats non publiés). Par comparaison, l'immunisation par les AES se traduit par un pourcentage de survie de 60 à 70%, 100 jours après l'infestation, la mort des animaux témoins survenant dans les 10 à 15 jours suivant l'infestation (Darcy, Maes et al., 1992).

Par ailleurs, des études antérieures menées dans le laboratoire ont montré que la protéine GRA2 native est reconnue par les sérums humains d'infection (Decoster, Darcy et al., 1988a).

Nous avons donc dans un premier temps, voulu savoir si la protéine recombinante exprimée chez *E. coli* conserve les propriétés immunologiques de l'antigène natif. Cette étude visait en particulier à mettre en évidence les épitopes B de la protéine GRA2 reconnus par les sérums humains d'infection.

A/ CARACTÉRISATION DE L'ÉPITOPE RECONNU PAR L'ACMC TG17-179 (Molecular Immunology, (1992) 29 : 1375-1382)

Le criblage de la banque d'expression construite dans λ gt11 à l'aide de l'AcMc TG17-179 (Charif, Darcy et al., 1990) a permis de façon inattendue, d'isoler un clone d'ADNc nommé FM3 (450 pb) ne codant que pour les 5 acides aminés C-terminaux de GRA2 et pourtant reconnu par l'AcMc. L'isolement de ce clone a permis de définir précisément l'épitope reconnu par TG17-179.

Pour cela, des peptides de synthèse de taille récurrente et correspondant aux acides aminés C-terminaux de la protéine GRA2 ont été synthétisés. Leur utilisation dans un système ELISA, en compétition avec le lysogène du clone d'ADNc FM16 (650 pb, 59 a. a.) a montré que l'immunoréactivité de l'AcMc TG17-179 était conservée vis-à-vis des peptides correspondant au moins aux 8 acides aminés C-terminaux de la protéine mais qu'elle était perdue pour des peptides de taille inférieure ou égale aux 6 a. a. C-terminaux de la protéine.

L'épitope optimal minimum reconnu par l'AcMc est donc constitué par les 8 acides aminés C-terminaux de la protéine, enchaînés de façon linéaire. La substitution de la fonction carboxy-terminale de cet octapeptide ne semble pas modifier l'immunoréactivité de l'épitope.

De plus, un test de compétition a montré que la fixation de l'AcMc TG17-179 sur le lysogène du clone FM16 pouvait être inhibée par des sérums humains d'infection, ceci démontrant que l'épitope défini par l'AcMc TG17-179 est aussi un épitope majeur reconnu par les sérums humains d'infection.

B/ PRODUCTION DES MOLECULES RECOMBINANTES CHEZ *E. COLI*

Du fait de l'intérêt diagnostique potentiel de GRA2 (Decoster, Darcy et al., 1988a ; Cesbron-Delauw, Boutillon et al., 1992) et des résultats de protection particulièrement encourageants obtenus avec la protéine native, nous avons tenté d'exprimer GRA2 sous forme recombinante dans un système procaryote (*E. coli*), ceci afin d'obtenir une protéine pure, en quantité suffisante pour étudier de façon plus extensive ses propriétés antigéniques, immunogéniques et protectrices et de rechercher si la protéine recombinante garde les propriétés immunologiques de l'antigène natif. Le clonage dans le même vecteur d'expression du gène codant pour l'antigène GRA1 (Cesbron-Delauw, Guy et al., 1989) devait nous permettre de comparer les résultats obtenus pour GRA1 à ceux obtenus pour GRA2.

Nous avons choisi le vecteur d'expression pGEX (Smith and Johnson, 1988) qui permet de produire dans *E. coli*, un polypeptide recombinant en fusion avec la Sj26-GST (Glutathion-S-Transférase de *Schistosoma japonicum*) et facilement purifiable sur glutathion-agarose. La protéine recombinante peut également être séparée de la protéine Sj26 grâce à la présence entre les deux polypeptides en fusion, d'un site de clivage protéolytique par la thrombine (dans le cas de pGEX-2T) ou par le facteur de coagulation sanguine Xa (dans le cas de pGEX-3X) (Smith and Johnson, 1988).

Plusieurs constructions ont ainsi été réalisées (figure 8). Les clones d'ADNc correspondant à la séquence entière des protéines GRA1 et GRA2 (clones Tx11 correspondant à la construction pTG.GRA1.1 ; clones L et 59.1.1 correspondant aux constructions pTG.GRA2.4 et pTG.GRA2.6 respectivement) ont tout d'abord été clonés dans le vecteur pGEX. La présence dans ces constructions, de tout (pTG.GRA1.1, pTG.GRA2.1 et pTG.GRA2.4) ou partie (pTG.GRA2.6) de la séquence hydrophobe N-terminale du peptide signal ne nous a pas permis de produire les protéines recombinantes en quantité détectable sur gel SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie, vraisemblablement en raison de la mauvaise solubilisation de ces polypeptides de fusion.

Les mêmes constructions, délétées de la séquence hydrophobe du peptide signal ont alors été clonées dans le vecteur pGEX3X (constructions pTG.GRA1.2 et pTG.GRA2.7) (figure 8). Ces constructions permettent de produire des protéines de fusion de 42 et 43 kDa

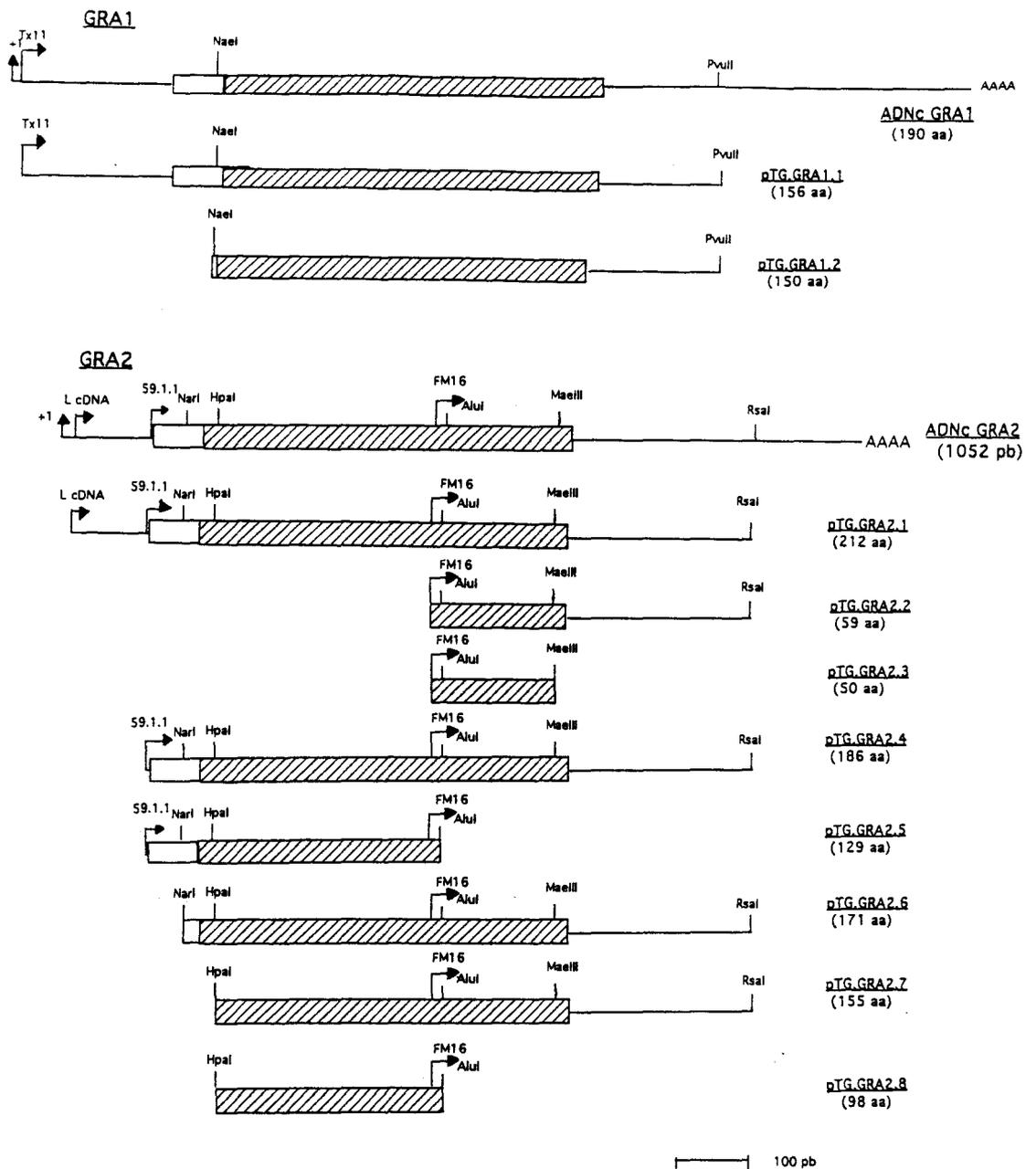


Figure 8 : Sous-Clonage de *GRA1* et *GRA2* dans les vecteurs pGEX2T ou pGEX3X.

Les régions transcrites des gènes *GRA1* et *GRA2* sont représentées en haut de la figure, le cadre ouvert indiquant le peptide signal probable et le cadre hachuré, le polypeptide mature. Les fragments sous-clonés sont représentés sous la région transcrite. Leurs extrémités correspondent à des sites de restriction enzymatique (indiqués sur la figure) ou au début d'un clone d'ADNc (clone Tx11 pour *GRA1* ; clones L, 59.1.1 et FM16 pour *GRA2*). La longueur en acides aminés (aa) du fragment exprimé est indiquée sous le nom de la construction.

respectivement (figure 9A, pistes 1 et 5). Des fragments issus de GRA2, correspondant à sa partie N-terminale (pTG.GRA2.8, figure 8) et C-terminale (pTG.GRA2.2 et pTG.GRA2.3, figure 8) ont également été produits dans le même système. Le poids moléculaire théorique des polypeptides de fusion correspondants est de 37 kDa (fragment N-terminal, figure 9A, piste 2), 32 kDa (fragment C-terminal, construction pTG.GRA2.2, figure 9A, piste 3) et 31.5 kDa (construction pTG.GRA2.3).

L'immunoréactivité de ces polypeptides recombinants avec les anticorps monoclonaux anti-GRA1 et anti-GRA2 (Charif, Darcy et al., 1990) et avec le sérum de souris dirigé contre la protéine GRA2 native purifiée par HPLC (Mercier, Lecordier et al., 1993) a également été testée (figure 9, partie B). Les polypeptides recombinants correspondant aux séquences complètes de GRA1 et GRA2 sont reconnus respectivement par l'AcMc TG17.43 anti-GRA1 (figure 9B, piste 1) et par l'AcMc TG17.179 anti-GRA2 (figure 9B, piste 5) ainsi que par le sérum de souris anti-GRA2 native (figure 9B, piste 4). Les polypeptides recombinants correspondant aux parties N- et C-terminales de GRA2 sont quant à eux, tous reconnus par le sérum de souris anti-GRA2 native (figure 9B, pistes 2, 7 et 10) alors que seul, le polypeptide de fusion correspondant à la construction pTG.GRA2.2 est reconnu par l'AcMc TG17.179 anti-GRA2 (figure 9B, pistes 3, 8 et 11). En effet, seule cette construction contient les 8 a. a. C-terminaux de GRA2 reconnus par l'AcMc TG17.179 (Cesbron-Delauw, Boutillon et al., 1992).

L'immunoréactivité de tous les polypeptides de fusion produits a été testée en contrôle avec un sérum de souris anti-GST recombinante produite chez *E. coli* (figure 9B, pistes 6, 9 et 13).

C/ IMMUNOGENICITE ET ANTIGENICITE DES POLYPEPTIDES RECOMBINANTS

Les polypeptides de fusion issus de GRA1 et GRA2 et produits chez *E. coli* ont d'une part été utilisés pour produire des sondes anticorps monospécifiques. Les polypeptides issus de GRA2 ont d'autre part été utilisés pour rechercher les épitopes B reconnus par les sérums humains d'infection toxoplasmique. L'utilisation de l'antigène GRA1 recombinant à des fins diagnostiques a également été envisagée.

1°/ Obtention de sondes anticorps monospécifiques (coll. D. Deslée)

Les polypeptides de fusion GST-GRA1 (pTG.GRA1.2) et GST-GRA2 (pTG.GRA2.7) ainsi que les fragments N- et C-terminaux recombinants issus de GRA2 (constructions pTG.GRA2.8, pTG.GRA2.2 et pTG.GRA2.3) ont été utilisés pour immuniser des souris OF1. L'immunoréactivité des sérums obtenus, vis-à-vis d'un extrait S2-CHAPS de tachyzoïtes, est présentée sur la figure 9C. Une bande d'environ 27 kDa correspondant à l'antigène GRA1 natif est ainsi mise en évidence par le sérum anti-GST-GRA1 (piste 1). Des bandes d'un poids moléculaire apparent de 28 kDa correspondant à l'antigène natif GRA2 sont mises en

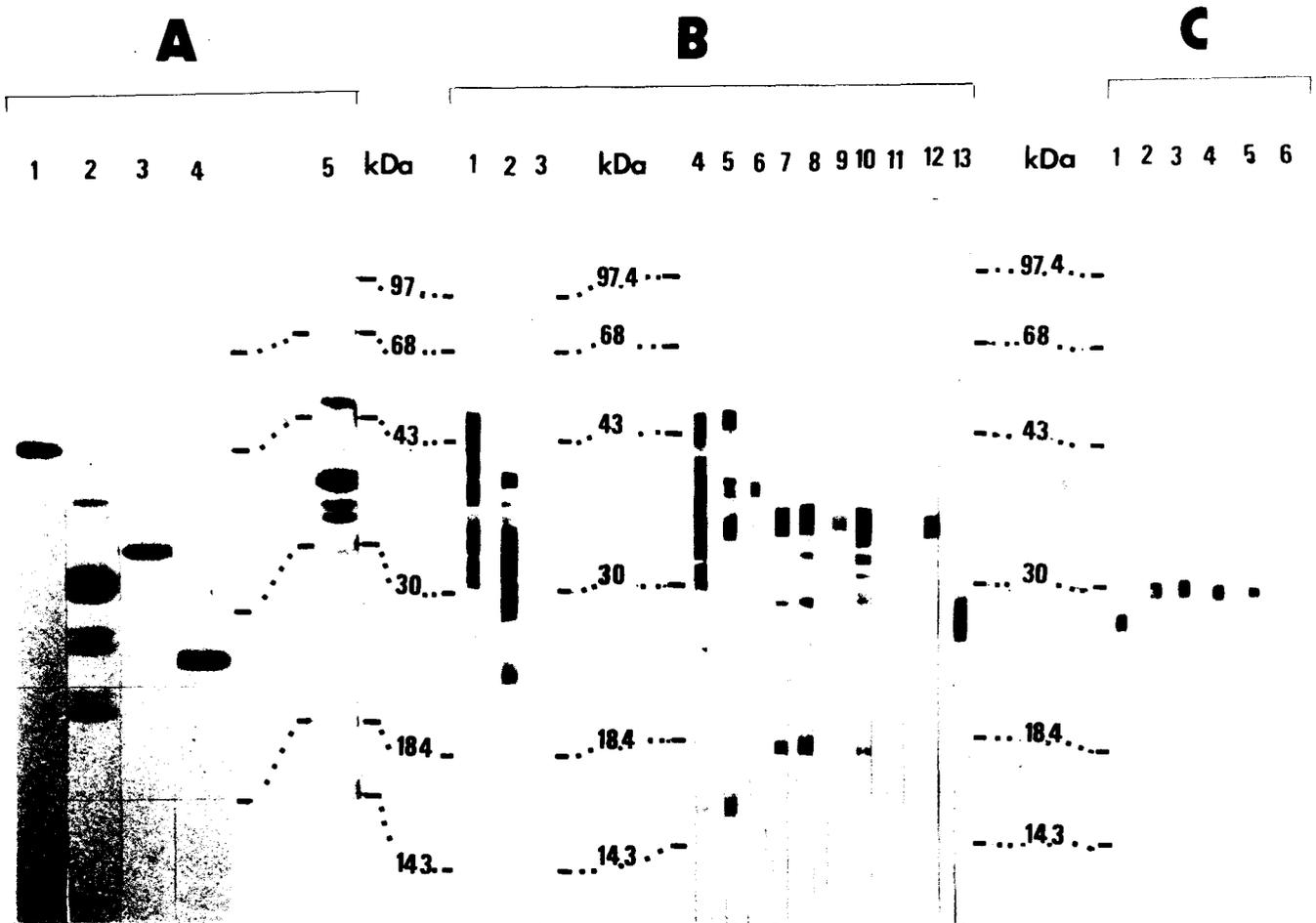


Figure 9 : Production chez *E. coli* des polypeptides issus de GRA1 et GRA2 et exprimés dans le vecteur pGEX

(A) Les polypeptides recombinants fusionnés à la Glutathion-S-Transférase Sj26 sont purifiés sur glutathion-agarose. Une fraction aliquote (environ 4 μ g) est analysée en SDS-PAGE 13% en conditions réduites et colorée au Bleu de Coomassie. 1 : pTG.GRA1.2 ; 2 : pTG.GRA2.8 (fragment N-terminal) ; 3 : pTG.GRA2.2 (fragment C-terminal) ; 4 : GST native ; 5 : pTG.GRA2.7 (polypeptide mature).

(B) Après transfert d'un gel identique sur nitrocellulose, les polypeptides recombinants sont mis en évidence par incubation avec différents sérums (1/100) et anticorps monoclonaux (1/200) (Charif, Darcy et al., 1990) puis révélés par un conjugué marqué à la peroxydase. Antigènes : 1 : pTG.GRA1.2 ; 2 et 3 : pTG.GRA2.8 ; 4, 5 et 6 : pTG.GRA2.7 ; 7, 8 et 9 : pTG.GRA2.2 ; 10, 11 et 12 : pTG.GRA2.3 ; 13 : GST native. Anticorps : 1 : AcMc TG17-43 anti-GRA1 ; 2, 4, 7 et 10 : sérum de souris dirigé contre la protéine GRA2 native purifiée par HPLC ; 3, 5, 8 et 11 : AcMc TG17.179 anti-GRA2 ; 6, 9, 12 et 13 : sérum de souris anti-GST recombinante.

(C) Analyse de la spécificité des sérums obtenus après immunisation de souris avec les polypeptides recombinants. Les souris sont immunisées 4 fois à 15 jours d'intervalle, avec 20 μ g de protéine de fusion. Les sérums obtenus sont analysés en western blot sur un extrait S2-CHAPS de tachyzoïtes (gel SDS-PAGE 13%, conditions réduites). Piste 1 : sérum anti-pTG.GRA1.2, piste 2 : sérum anti-pTG.GRA2.8, piste 3 : sérum anti-pTG.GRA2.7, piste 4 : sérum anti-pTG.GRA2.2, piste 5 : sérum contrôle anti-GST.

évidence à l'aide de tous les sérums obtenus par immunisation avec les polypeptides recombinants issus de GRA2 (pistes 2 à 5). Le sérum contrôle anti-GST ne révèle quant à lui, aucune bande sur le blot (piste 6).

L'utilisation en microscopie électronique de ces sondes anticorps pourra ainsi nous permettre de connaître l'orientation de la molécule GRA2 de part et d'autre des membranes du réseau, à l'intérieur de la vacuole parasitophore (coll. Dr. L. D. Sibley).

2°/ Cartographie des épitopes B de l'antigène GRA2 reconnus par les sérums humains d'infection (*Applied Parasitology* (1993), 34 : 235-244)

La mise au point d'un système d'ELISA direct utilisant le polypeptide de fusion pTG.GRA2.7 comme antigène (figure 8) a permis de montrer que les 59 acides aminés C-terminaux de GRA2 étaient reconnus par 75% (33/44) des sérums humains chroniques d'infection et par 82.6% (19/33) des sérums aigus. Parmi 10 des 11 sérums chroniques négatifs contre les 59 a. a. C-terminaux de GRA2, 8 réagissent en immunoblot avec le polypeptide pTG.GRA2.1 correspondant à la séquence complète de GRA2 (figure 8).

La réactivité des sérums chroniques et aigus contre les 59 acides aminés C-terminaux de GRA2 est plus ou moins inhibée quand les sérums sont co-incubés avec le peptide synthétique correspondant aux 15 acides aminés C-terminaux de GRA2 (Cesbron-Delauw, Boutillon et al., 1992).

Ces résultats confirment que les 15 acides aminés C-terminaux contiennent un épitope B reconnu par les sérums humains de phase chronique et aiguë. Ils montrent également qu'un second épitope existe dans les 59 acides aminés C-terminaux de la protéine, en amont des 15 a. a. C-terminaux et qu'au moins un épitope est contenu dans les 96 a. a. N-terminaux de GRA2.

Malgré l'utilisation d'un "cocktail" d'inhibiteurs approprié aux protéines de granules denses de *T. gondii* (Dr. L. D. Sibley, communication personnelle), l'extrême sensibilité aux protéases bactériennes du polypeptide de fusion correspondant à la partie N-terminale de GRA2 (construction pTG.GRA2.8, figure 8) n'a pas permis de l'utiliser en ELISA afin de confirmer les résultats obtenus en immunoblot (Murray, Mercier et al., 1993).

Afin de préciser la cartographie des épitopes B de l'antigène GRA2, la production d'autres fragments recombinants dérivés de GRA2 est envisagée. En particulier, l'expression du peptide 24-69 correspondant à la partie N-terminale de GRA2 devrait nous permettre de produire un polypeptide recombinant plus soluble et plus stable.

3°/ Mise au point d'un système ELISA-IgG utilisant l'antigène recombinant GST-
GRA1 (coll. Dr. M. F. Cesbron-Delauw, M. P. Fourmaux)

L'antigène GRA1, exprimé chez *E. coli*, dans le vecteur pGEX3X (construction pTG.GRA1.2, figure 8 ; figure 9, piste 1), a permis la production d'une protéine de fusion soluble et stable dont le rendement de production et de purification est d'environ 100 à 150 µg par litre de culture bactérienne. Le rendement de clivage du polypeptide de fusion par le facteur Xa est quant à lui resté trop faible pour envisager toute utilisation du polypeptide GRA1 clivé (résultats non présentés).

Le polypeptide de fusion GST-GRA1 (construction pTG.GRA1.2, figure 8) a été utilisé dans un système ELISA direct, semblable à celui décrit par Murray et col. (Murray, Mercier et al., 1993), ceci afin de doser les IgG des sérums humains d'infection (sérums fournis par le Dr. A. Decoster, Hôpital Saint-Antoine, Lille). Le seuil de positivité, déterminé sur 45 sérums négatifs dans les tests conventionnels et majoré de 3 écarts-type est de 0.163. Dans ces conditions, 97.8% des 45 sérums testés ont été trouvés négatifs dans le tests IgG-ELISA-GRA1 (figure 10A). 138 sérums, positifs dans les tests classiques mais de titres en IgG divers, ont ensuite été testés dans ce système : tous titres confondus, 76.8% d'entre eux se sont révélés positifs (figure 10A). Par contre, la sensibilité de ce test, bien que bonne pour les sérums de titre élevé (95.8% de sensibilité pour des sérums de titre ≥ 250 U.I.), s'est révélée trop faible pour les sérums de titre faible en IgG (51.7% et 61.5% seulement pour des titres ≤ 50 U.I. ou compris entre 50 et 100 U.I. respectivement) (figure 10B).

Des résultats préliminaires obtenus par ailleurs dans le laboratoire, nous laissent cependant espérer une amélioration de la sensibilité de ce test. En effet, certains sérums, négatifs dans le test IgG-ELISA utilisant le polypeptide de fusion correspondant aux 59 a. a. de GRA2 (construction pTG.GRA2.2, (Murray, Mercier et al., 1993)) sont positifs dans le test IgG-ELISA-GRA1. De plus, des résultats obtenus sur un petit nombre de sérums ont montré que l'antigène recombinant GRA6 produit par le vecteur pGEX (Lecordier, Dubremetz et al., in preparation) est bien reconnu par les sérums humains d'infection chronique et aiguë. L'antigène GRA5 recombinant (Lecordier, Mercier et al., 1993), bien que présentant des réactions antigéniques croisées avec l'antigène GRA6 (Lecordier, Dubremetz et al., in preparation) ne semble par contre pas reconnu (Murray et col., résultats non publiés).

Sur la base de ces résultats, l'utilisation d'un "cocktail" de molécules recombinantes issues par exemple de GRA1, GRA2 et GRA6 devrait peut-être permettre de détecter presque tous les sérums chroniques d'infection toxoplasmique. L'utilisation de ces antigènes recombinants dans un test de diagnostic de "seconde génération", fiable, sensible et utilisable pour le dépistage systématique de l'immunité anti-toxoplasmique, pourrait donc être envisagée.

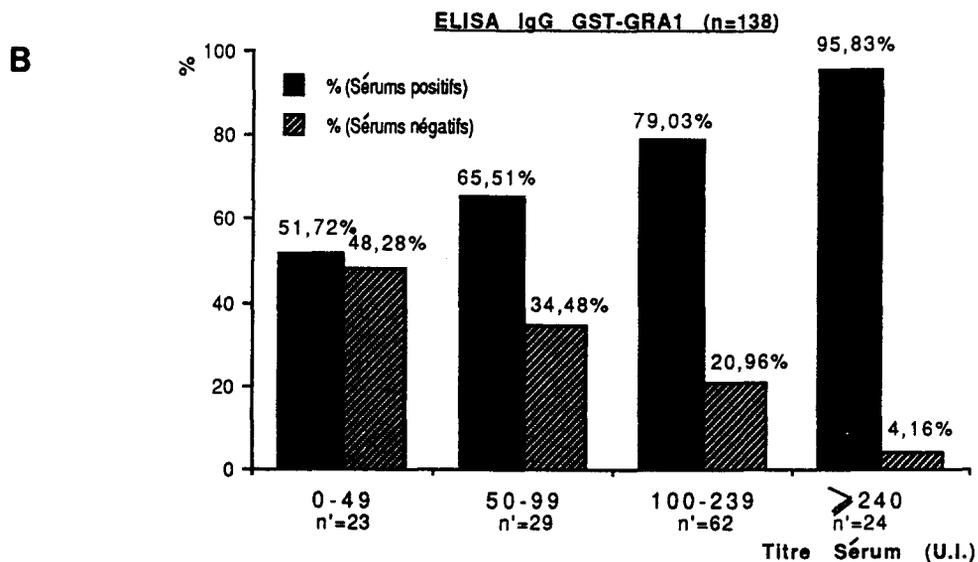
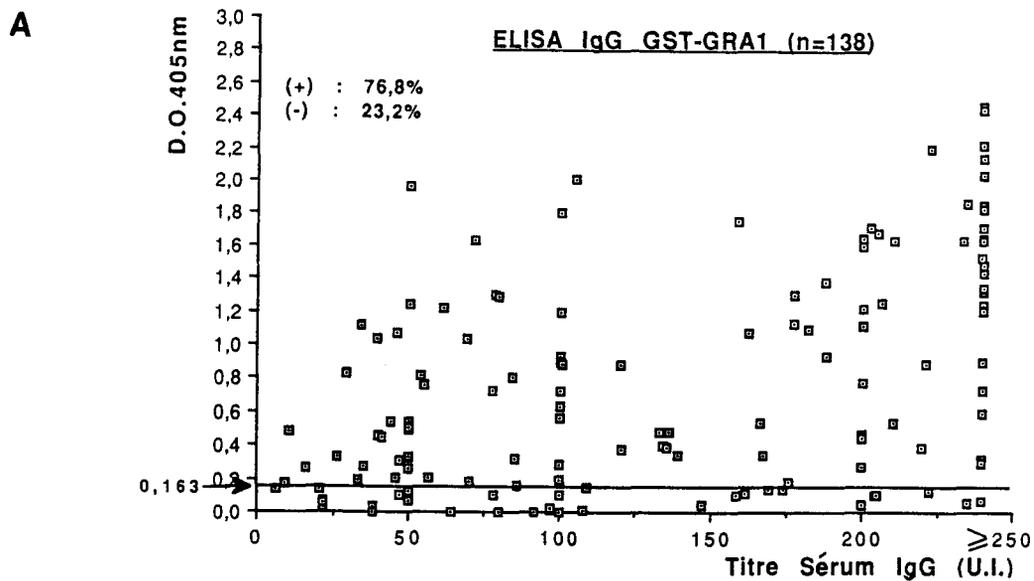


Figure 10 : Test IgG-ELISA GST-GRA1 réalisé sur 138 sérums humains

(A) L'axe des abscisses indique le titre en IgG (UI) des sérums testés, tel qu'il est défini par les tests conventionnels. L'axe des ordonnées indique la valeur de la D.O.405.

(B) L'axe des abscisses correspond au titre en IgG (UI) des sérums testés, tel qu'il est défini par les tests conventionnels. L'axe des ordonnées correspond au pourcentage de sérums positifs dans ce test.

AMINO ACID SEQUENCE REQUIREMENTS FOR THE EPITOPE RECOGNIZED BY A MONOCLONAL ANTIBODY REACTING WITH THE SECRETED ANTIGEN GP28.5 OF *TOXOPLASMA GONDII*

M. F. CESBRON-DELAUW,* C. BOUTILLON,† C. MERCIER,* M. P. FOURMAUX,* A. MURRAY,*
F. MIQUEY,* A. TARTAR† and A. CAPRON*

*Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire, Unité Mixte INSERM U167-CNRS 624, Institut Pasteur Lille, 1 rue du Pr A. Calmette, B.P. 245, 59019 Lille Cédex, France and †Laboratoire de Chimie des Biomolécules, URA 1309, Institut Pasteur Lille, 1 rue du Pr A. Calmette, B.P. 245, 59019 Lille Cédex, France

(First received 26 December 1991; accepted in revised form 4 April 1992)

Abstract—We have characterized in detail, the epitope of the secreted antigen GP28.5 recognized by the mouse monoclonal antibody TG 17-179 using synthetic peptides and a truncated recombinant fusion protein.

The screening of a *T. gondii* expression library with TG17-179 mAb led to the isolation of cDNAs clones, all encoding for the C-terminal region of GP28.5 and with one encoding for only the five last C-terminal residues.

Competitive ELISA with longer peptides revealed that the immunoreactivity was retained for peptides of eight residues or longer, and lost when the peptide was reduced to the six last C-terminal residues or less. Experiments with the octapeptide lacking the carboxy-terminal glutamine residue showed it to be 64-fold less active. Moreover, neither addition of residues in the carboxy-end nor substitution of COOH function changed the immunoreactivity of the epitope.

Competition experiments between TG17-179 mAb and sera from infected individuals demonstrates that the epitope defined by a mouse monoclonal probe is also a major epitope for human polyclonal antibodies.

These results describe the sequence requirements within a probably linear epitope and give rise to some general question concerning experimental test for epitope mapping.

INTRODUCTION

Excreted-secreted antigens (ESAs) of the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*, an important intracellular pathogen in human (McCabe and Remington, 1988) and veterinary medicine (Dubey and Welcome, 1988), have been found in our laboratory to be highly immunogenic and hence are being studied as diagnostic reagents and as immunogens for a vaccine (Decoster *et al.*, 1988; Darcy *et al.*, 1988; Duquesne *et al.*, 1990).

Recent work has begun to elucidate the molecular structure of these ESAs. In this context, we have reported the cloning and expression of the gene encoding the precursor of a 23 kDa ESA with calcium binding properties (Cesbron-Delauw *et al.*, 1989). Moreover, we have generated three monoclonal antibodies TG 17-43, TG 17-179 and TG 17-114 recognizing the 23 kDa species, a 28.5 kDa and a 21 kDa ESA, respectively (Charif *et al.*, 1990). Immunogold staining revealed that the three molecules are stored in the dense granules of toxoplasma cells and are released in the host cell vacuole after invasion (Cesbron-Delauw *et al.*, 1989; Charif *et al.*, 1990).

Epitope mapping of these antigens has begun with the characterization of T cell epitopes using synthetic peptides derived from the primary structure of the P23 antigen. Two C-terminal peptides (170-193 and 194-208) have been identified as T cell epitopes in rats,

whilst the former is also a B cell epitope since it is recognized by the TG 17-43 mAb (Duquesne *et al.*, 1991).

The present investigation was initiated to further characterize the polypeptide structure of the glycosylated 28.5 kDa component which is recognized by the TG 17-179 mAb. We describe below the cloning of cDNAs encoding a GP28.5 epitope and, using overlapping synthetic peptides in a competitive ELISA, we define the essential requirements of the putative epitope for TG 17-179 mAb.

MATERIALS AND METHODS

Production of the TG17-179 monoclonal antibody

TG 17-179 mAb was produced by immunizing BALB/C mice with ESAs as described previously (Charif *et al.*, 1990).

Human sera

Sera were tested for the presence of IgG, IgM, IgA antibodies detected using Diagnostic Pasteur PLATE-LIA IgG, IgM and IgA tests.

Immunological screening of the expression library

Construction of the *Toxoplasma* cDNA library in lambda gt11 had been previously described (Cesbron-

Delauw *et al.*, 1989). The amplified library was plated on *E. coli* Y1090 and screened using the mAb TG17-179. Replicates were developed by subsequent incubation with peroxidase conjugated anti-mouse antibodies. Final staining in the presence of a 4-chloro-1 naphthol resulted in the selection of three independent candidates FM3, FM1 and FM16.

DNA sequencing

EcoRI restriction fragments were subcloned into M13 mp18 and mp19 and sequenced by the dideoxy-chain termination method (Sanger *et al.*, 1985) using [³⁵S] α -ATP, T7 DNA-polymerase and oligonucleotides M13 (-20) primers in both orientation.

Preparation of fusion protein

Recombinant lysogens 16 of the λ gt11 original clone FM16 were produced in *E. coli* Y1089 as described by Huynh *et al.* (1985). Crude lysates containing wild type β -galactosidase or β -galactosidase fusion protein were prepared by inducing log-phase cultures with heating to 45°C for 20 min and addition of isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside to 10 mM. After additional growth at 37°C for 1 hr, the culture was concentrated, in 0.01 M Tris pH 8, 0.1 M EDTA, 10 mM NaCl, lysed by adding 0.25 mg lysozyme, 0.01 M MgCl₂ and 0.2% TRITON and treated lightly with DNase I at 37°C for 30 min.

Production of synthetic peptides

The peptides were manually synthesized using the conventional solid-phase "Boc-benzyl strategy" (Merifield, 1963). Ter-butyloxycarbonyl (t-Boc) protected amino acids were purchased from Novabiochem AG (Läufelfingen, Switzerland). Side chain protection were as follows: arginine (tosyl), aspartic acid (*o*-benzyl ester), histidine (N^{im}-dinitrophenyl) and serine (*o*-benzyl ether). Resins for solid phase peptide synthesis were *p*-methylbenzylhydramine (Pietta and Marshall, 1970) (Applied Biosystems, Foster City, U.S.A.) for the octapeptide obtained with a carboxamide C-terminal end, and phenylacetamidomethyl (Mitchell *et al.*, 1976) (Applied Biosystems, Foster City, U.S.A.) for all other peptides.

The 13 truncated N-terminal peptides (Table 1) with regard to the complete pentadecapeptide (PQQRAAHVPVPDFSQ), were prepared during its synthesis by taking off about 200 mg of dried resin after each coupling step. The two C-terminal modified peptides and the four truncated C-terminal peptides (Table 1), with regard to the octapeptide (VPVPDFSQ), were all prepared in separate syntheses.

Peptides which contained histidine were treated three times with 20% mercaptoethanol/2% DIEA in DMF for 120 min each time, in order to remove the dinitrophenyl group.

Then, the N-terminal t-Boc groups were removed with 50% TFA, the resins were dried and all the peptides were cleaved and deprotected in a vessel modified to allow reaction on six peptide resins at once, a "multipost" Teflon-Kel F-HF apparatus (ASTI, Courbevoie, France), by a high-HF procedure in HF, *p*-cresol and

dimethyl sulfide (85:10:5) for one hr at 0°C. The cleaved deprotected peptides were precipitated and washed with cold diethylether, and then dissolved in 5% acetic acid and lyophilized.

Crude peptides were checked for homogeneity by reverse phase HPLC and for identity by amino acid analysis after total acid hydrolysis. As crude peptides were all 80-95% pure, no further purification was undertaken.

ELISA

Two types of ELISA were carried out: the first one to test the ability of peptides to inhibit the binding of TG17-179 mAb to the recombinant antigens FM16, the second to test the binding of TG17-179 mAb to synthetic peptides coated on microtiter plates.

1. *Competitive ELISA*. Wells of microtiter plates were coated with the lysogen 16 extracts in 100 mM sodium carbonate pH 9.6 at 4°C overnight, and blocked with 0.1% gelatin in phosphate buffered saline (PBS) pH 7.4, for 2 hr at 20°C. After washing three times with PBS/0.4% Tween 20, TG17-179 mAb mixed with various concn of peptides diluted in PBS/gelatin were incubated on the plates. For each trial, a dilution of TG 17-179 was chosen to give an O.D. of 1.0 at 492 nm.

The plates were incubated for 3 hrs at 37°C, washed extensively (three times) with PBS/Tween 20 before adding the second antibody (Horseradish peroxidase conjugated goat anti-mouse IgG) at a dilution of 1:10 000 and incubating for a further 90 min at 37°C. After washing, bound second antibody was visualized by addition of *o*-phenylenediamine, 0.001% H₂O₂ in 50 mM Na₂HPO₄, 20 mM citric acid, pH 5.2. After 30 min incubation at 37°C, absorbance at 492 nm was then recorded after termination with 0.5 M H₂SO₄.

2. *Direct ELISA*. The same procedure as above was used, except that the wells were coated with 200 μ l of peptide (0.54×10^{-5} M) and that the plates were incubated with TG17-179 mAb alone.

3. *Inhibition experiments with human sera*. The reactivity of anti-toxoplasma human antibodies with the C-terminal epitope was determined by an inhibition assay using the TG17-179 mAb and human sera.

The binding of TG17-179 mAb to FM16 recombinant antigen was tested in the competitive ELISA described above and the human sera were added at a final dilution 1/100 to the mAb diluent.

SDS-PAGE and immunoblotting was performed according to Laemmli (1970) and to the technique of Towbin *et al.* (1979), respectively.

RESULTS

Isolation and characterization of cDNA clones

Upon screening our toxoplasma cDNA library constructed in λ gt11, with the mAb TG17-179, three clones namely FM3, FM1 and FM16 were isolated. FM1 and FM16 strongly reacted with the mAb compared to FM3 reactivity (Fig. 1). Restriction map showed that the

Table 1. Inhibition of the monoclonal antibody TG 17-179 binding to the GP28.5 β -Gal fusion protein by synthetic peptides

Peptides	Sequences	IC ₅₀ (μ M)
a 15 aa peptide Ct	P Q Q R A A H V P V P D F S Q	0,32
14 aa peptide Ct	Q Q R A A H V P V P D F S Q	0,35
13 aa peptide Ct	Q R A A H V P V P D F S Q	0,40
12 aa peptide Ct	R A A H V P V P D F S Q	0,40
11 aa peptide Ct	A A H V P V P D F S Q	0,45
10 aa peptide Ct	A H V P V P D F S Q	0,79
9 aa peptide Ct	H V P V P D F S Q	0,80
8 aa peptide Ct	V P V P D F S Q	0,89
7 aa peptide Ct	P V P D F S Q	7,08
6 aa peptide Ct	V P D F S Q	> 100
5 aa peptide Ct	P D F S Q	> 100
4 aa peptide Ct	D F S Q	> 100
3 aa peptide Ct	F S Q	> 100
2 aa peptide Ct	S Q	> 100
1 aa Ct	Q	> 100

b 8-1 aa peptide Ct	V P V P D F S	57,22
8-2 aa peptide Ct	V P V P D F	92,64
8-3 aa peptide Ct	V P V P D	> 100
8-4 aa peptide Ct	V P V P	> 100

c 8 aa peptide Ct (+ NH ₂)	V P V P D F S Q(-NH ₂)	1,43
8 aa peptide Ct (+ A A)	V P V P D F S Q A A	1,43

(a) Peptides from 15 to 1 residues synthesized by truncating the *N*-terminal portion.

(b) Peptides from 8 to 4 residues truncated in *C*-terminus residues.

(c) The *C*-terminal octapeptide with substitution of the free α -carboxylic group in a amide group (Ct + NH₂) or with two additional Alanine residues at the carboxy-end (Ct + AA). IC₅₀ is the inhibitory concn of peptides expressed in micromolar that gives 50% of inhibition.

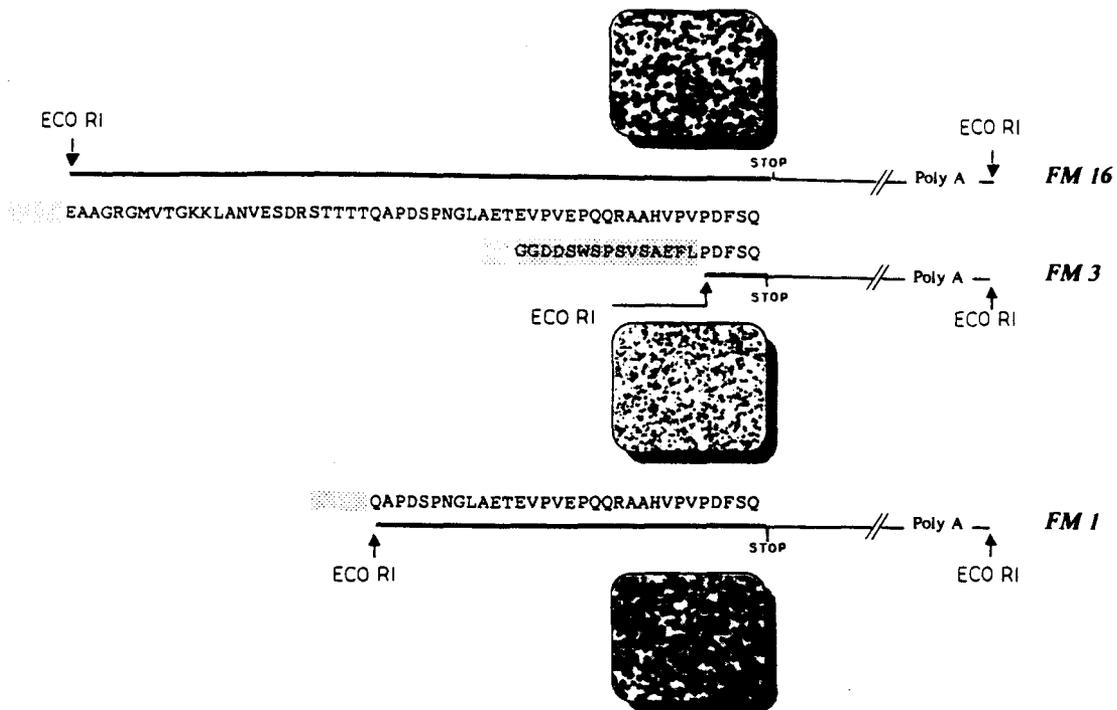


Fig. 1. Restriction maps and amino acid sequences of the cDNA clones isolated from the λ gt11 library using the TG17-179 mAb. The *EcoRI* inserts of FM16, FM3 and FM1 (650 bp, 450 bp and 550 bp, respectively) contain overlapping sequences including the polyA tail. The thick black line represents the coding sequence in frame with the β -galactosidase gene. The amino acid sequences are deduced from the cDNA sequences. The stippled area represents the β -galactosidase sequence upstream of the fusion proteins. The immunodetection of the recombinant plaques is framed either above (FM16) or under (FM1 and FM3) the corresponding cDNA map. This illustrates that FM3 expresses a weaker antigen than do FM16 and FM1.

EcoRI inserts of 450 pb (FM3), 550 pb (FM1) and 650 pb (FM16) contained overlapping sequence (Fig. 1).

Surprisingly, sequencing revealed in frame with β -galactosidase an ORF of only 17 bp for FM3, 95 bp and 172 bp for FM1 and FM16, respectively, followed by a 3' untranslated region plus the polyA tail. This allowed us to directly map the peptidic epitope recognized by TG 17-179 in the carboxy-terminal region (Fig. 1). It seemed unlikely that the FM3 cross-reactivity was due to an homology between the amino acid sequence preceding the five last C-terminal residues in the β -galactosidase fusion protein and in the longer expressing clones (FM1, FM16) (Fig. 1).

It thus appeared that the five C-terminal amino acids were sufficient to maintain the antigenicity. However, the observation that the binding of the mAb TG 17-179 to the FM3 clone was weaker than to the longer one (Fig. 1) led us to determine the optimal length requirement for the epitope.

In addition, we found that the GP28.5 partial nucleotide sequence is homologous to the sequence of the gene encoding the previously described cytoplasmic P28 antigen (Prince *et al.*, 1989) recognized by the mAb named F3G3 (Sharma *et al.*, 1984) indicating that TG17-179 mAb and F3G3 mAb recognize the same protein.

Immunoreactivity of carboxy-terminus synthetic peptides

To explore the TG 17-179 epitope in more detail, overlapping peptides covering the sequence of the car-

boxy-terminal residues of GP28.5 (1-15 residues) were synthesized by truncating its N-terminal portion (see Table 1).

These were tested by a competitive ELISA with the β -gal fusion protein expressed by the lysogen 16 and coated on the plates.

As shown by the IC₅₀ data gathered in Table 1a, the optimal inhibition of the mAb TG 17-179 binding to the fusion protein is obtained with peptides containing 11-15 residues (IC₅₀ between 0.32 and 0.45 μ M). Inhibition is still obtained with the octapeptide containing the eight C-terminal residues (IC₅₀ = 0.89 μ M). The binding of TG 17-179 to the C-terminal heptapeptide proves to be eight-fold lower than the binding of the octapeptide. Finally, the immunoreactivity of synthetic peptide is lost when the peptide comprises the last six (or fewer) C-terminal residues.

In an attempt to further define the site recognized within the octapeptide, overlapping peptides truncated in C-terminus residues were next synthesized.

Whereas incubation of TG 17-179 with the synthetic octapeptide covering C-terminal residues inhibits the binding to the recombinant fusion protein, the corresponding heptapeptide lacking the carboxy-terminal glutamine residue was 64-fold less active as a competitor and the hexapeptide lacking the two carboxyterminal residues 104-fold less active (Table 1b).

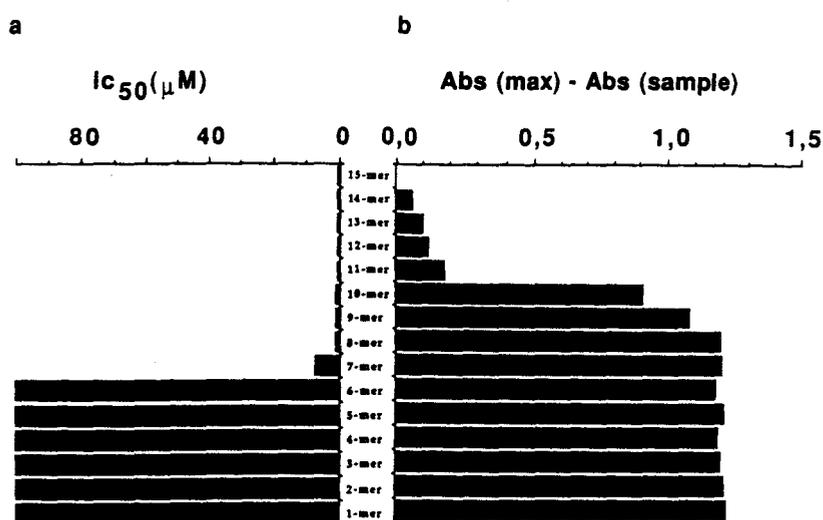


Fig. 2. Comparison of competitive ELISA (a) and direct ELISA (b) methodologies to test the length requirements for the epitope. IC₅₀: indicates the inhibitory concn giving 50% of inhibition. Abs: indicates the absorbance of the light at 490 nm. Number-mer: indicates the length of the overlapping peptides truncated in *N*-terminus residues of the carboxy-terminal sequence of GP28.5 (1–15 residues).

Immunoreactivity of the octapeptide lacking its carboxy-terminal function

The carboxy-terminal location requirement of the TG 17–179 epitope was further investigated using as competitors, the octapeptide lacking the COOH function and the octapeptide with two additional *C*-terminal residues (Alanine). As shown in Table 1c, these 2 competitors (IC₅₀ = 1.43 µM) have nearly the same activity as the *C*-terminal octapeptide (IC₅₀ = 0.89 µM). This indicates that the carboxyl function is not a requirement to keep the immunoreactivity of the TG 17–179 epitope.

Peptide length requirement on solid phase

Further investigations into the epitope for TG 17–179 were carried out using a direct ELISA with the peptides coated on the plate. The data in Fig. 2 show that the immunoreactivity as a function of the peptide length is more rapidly lost in direct ELISA (10 residues) when compared to the results obtained in the competitive ELISA (six residues). Therefore, in direct ELISA the mAb requires a longer peptide for recognition than it does in the inhibition test. In this particular case, a failure in coating of the shorter peptides is unlikely taking account of the hydrophobic nature of the amino acids in the truncated peptides (Canterero *et al.*, 1980).

Recognition of the *C*-terminal epitope by sera of infected humans

We finally investigated whether or not the postulated epitope also reacted with sera from humans with antibodies to *T. gondii*. Figure 3 shows a representative immunoblot demonstrating the reactivity of the FM16 fusion protein with antibodies in the serum of patients with acute infection (lane B) or with chronic toxoplasmosis (lanes C, D, E). Lanes F and G show that there is no binding of the antibodies to wild-type lysogen.

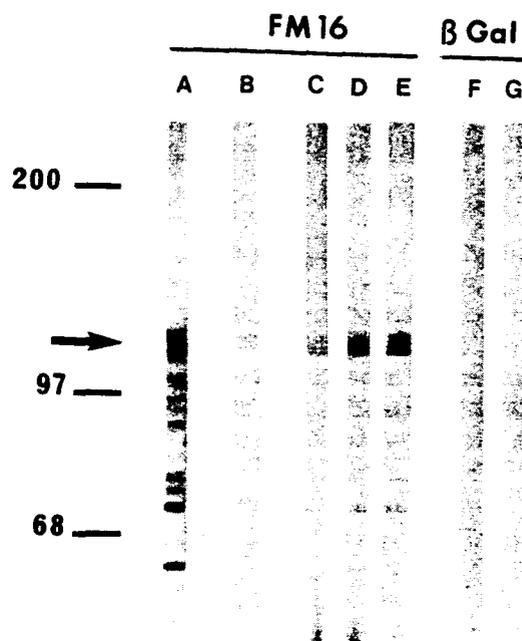


Fig. 3. A representative Western blot of lysogen expressing the FM16- β galactosidase fusion protein (FM16) and wild type lysogen expressing β galactosidase (β Gal). In lanes A and F, immunoblot using the TG17–179 mAb (diluted 1:200) and an anti-mouse IgG peroxidase conjugated. Lanes B to E and G were probed with human sera (diluted 1:100) and an anti-human IgG, A, M peroxidase conjugated; a serum of a patient with an acute toxoplasmosis (lane B) and 3 sera of patient with a chronic toxoplasmosis (lines C, D, E and G). These were classified using clinical and serologic parameters: (i) acute sera are sampled from patients during the first week after infection and characterized by the presence of IgM antibodies and (ii) chronic sera from patients more than one year after diagnosis. The arrow points out the major band corresponding to the β galactosidase fusion protein. The minor reactive bands correspond to a gradual degradation of the fusion protein. Numbers at left correspond to size (kDa) of proteins standards.

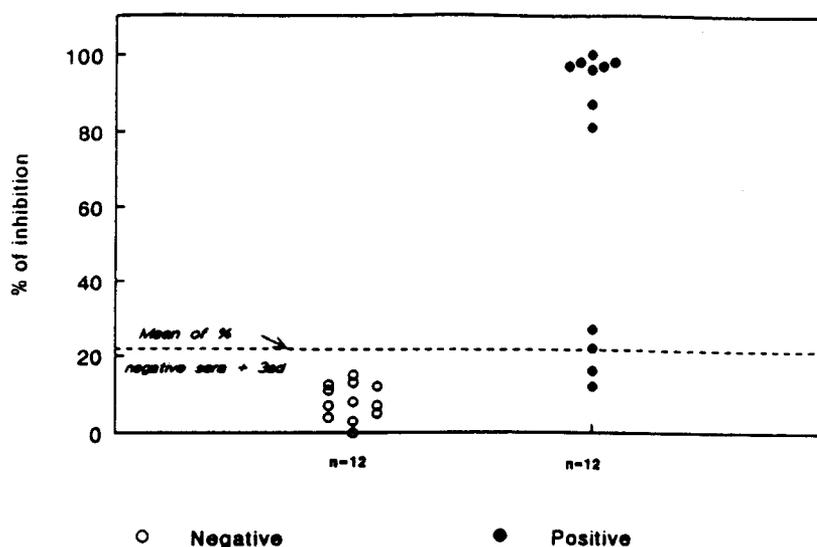


Fig. 4. Inhibition of TG17-179 mAb by human sera. The negative (○) and positive (●) sera ($n = 12$) were determined by conventional assays (see *Materials and Methods*), the average percentage of inhibition for negative sera is the mean + 3sd (20.2%). Ten positive human sera are above this % of inhibition.

Moreover, competition experiments between TG 17-179 and sera from infected individuals indicated that human polyclonal Ab may also react with the C-terminal postulated epitope (Fig. 4): out of the 12 human sera tested, 10 inhibited to varying extents the binding of TG17-179 mAb to the FM16 recombinant fusion protein (Fig. 4).

DISCUSSION

Our interest in epitope mapping comes from the use of a monoclonal antibody (TG 17-179) to screen an expression library in order to clone the GP28.5 ESA gene of *T. gondii*. The surprising observation was made that one of the selected clones encodes only for the five last carboxy-terminal residues.

The β -galactosidase sequence directly upstream of the shorter fusion protein (FM3, 5AA) did not present any amino acid identity with the GP28.5 sequence contained in the longer clone. Although this cDNA clone expresses an antigen which binds to TG 17-179 more weakly than those expressed by longer clones, these results show that a peptide sequence as short as five residues remains accessible to antibodies when carried by *E. coli* β -galactosidase. This causes us to question the fine specificity of the mAb. Interrogation of a sequence data bank (NBRF, 28.232 entries) for proteins containing the PDVSQ sequence only detected three proteins in only one of which the sequence is C-terminally located.

As reviewed by Van Regenmortel *et al.* (1988), the general definition of an epitope is "the smallest peptide that still possesses some residual antigenic reactivity. In general, this corresponds to a size of 5-7 amino acid residues". However, as it is confirmed in this study, the definition of an epitope also depends on the method used to test it (Muller *et al.*, 1986; Van Regenmortel, 1986, 1989). On solid phase, the minimal size requirement for

measurable binding activity of TG17-179 mAb was either 11 residues when peptides directly coated on the plate were tested in a ELISA test or five residues when a peptide in fusion with the β -galactosidase was tested in Western blotting.

In order to avoid the pitfall which consists to detect only a specific residual binding we have chosen to define the epitope for TG 17-179 using competition experiments. In this method, the capacity of the peptide to inhibit the binding of the mAb to the fusion protein is measured using peptides in solution. Such a condition which avoid any interference provided by the solid phase in terms of conformation or inaccessibility of hydrophobic side chains, indicates the minimum size allowing the peptide to interact in an efficient manner with the mAb. Since any truncation of the putative epitope at its N- or C-terminus leads to a dramatic decrease of its inhibiting capacity, we conclude that the octapeptide represents the optimal minimal size for the epitope. This is confirmed by the fact that any elongation of its N-terminal end did not significantly increase its inhibiting activity.

The TG 17-179 epitope shows another generally interesting feature. The data gathered in Table 1 clearly indicate that although the glutamine residue is important, its α -carboxylic group is not required. Substitution of the free α -carboxylic group in an amide group or addition of two residues at the carboxy-end position had no significant effect on the immunoreactivity of the postulated octapeptide epitope. In contrast, Wehland *et al.* (1984) have characterized a carboxy-terminal epitope for which the terminal α -carboxylate group had to be free to bind with a mAb YL 1/2 proving then that in this case the C-terminal location of the epitope is obligatory.

In summary, using cross-reactivity studies between a recombinant fusion protein and truncated peptides we

have mapped the epitope of the monoclonal antibody TG 17-179 (Charif *et al.*, 1990). As revealed by a competitive experiment, the TG 17-179 epitope is located at the carboxy-end of the GP28.5 secreted antigen of *T. gondii* and very likely represents a linear amino acid sequence of at least eight amino acid residues.

On the basis of deduced cDNA sequence and the subcellular distribution, the GP28.5 antigen appears identical to the antigen previously identified using the F3G3 mAb by Sibley and Sharma (1987) and cloned by Prince *et al.* (1989). On the basis of the subcellular location, it also probably recognizes the 28 kD antigen of the dense granules (GRA2) identified by Leriche and Dubremetz (1991) using the T51F5 mAb. However, in contrast to TG 17-179, and F3G3, the T51F5 does not detect the antigen within the parasite plasmalemma (Leriche and Dubremetz, 1991). These observations indicate that the T51F5 mAbs might not be directed against the C-terminal epitope described here. This could reflect a difference in the accessibility of the epitopes depending on the folding of the antigen at the particular subcellular location. Indeed, carboxy and amino-terminal regions of proteins are not generally involved in the highly organized motifs which constitute the core of a molecule. In many cases, they are even too flexible to allow proper determination by X-ray crystallography (Westhof *et al.*, 1984). So, they offer a particular location and antibodies raised against them are often cross-reactive with synthetic peptides (Palfreyman *et al.*, 1984).

Since, the carboxy-end epitope described here reacts with antibodies of naturally infected human, we are now trying to test it as a tool for immunological screening of toxoplasmosis and as immunogen for protective experiments.

Acknowledgements—The authors thank Dr A. Decoster for providing well referenced human sera, Dr F. Darcy and Dr J. F. Dubremetz for sharing unpublished results. They also wish to thank C. Colson and M. F. Massard for typing the manuscript.

REFERENCES

- Cantarero L. A., Butler J. E. and Osborne J. W. (1980) The adsorptive characteristics of proteins for polystyrene and their significance in solid-phase immunoassays. *Analyt. Biochem.* **105**, 375-382.
- Cesbron-Delauw M. F., Guy B., Torpier G., Pierce R. J., Lenzen G., Cesbron J. Y., Charif H., Lepage P., Darcy F., Lecocq J. P. and Capron A. (1989) Molecular characterization of a 23 kilodalton major antigen secreted by *Toxoplasma gondii*. *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.* **86**, 7537-7541.
- Charif H., Darcy F., Torpier G., Cesbron-Delauw M. F. and Capron A. (1990) *Toxoplasma gondii*: characterization and localization of antigens secreted from tachyzoites. *Exp. Parasitol.* **71**, 114-124.
- Darcy F., Deslée D., Santoro F., Charif H., Auriault C., Decoster A., Duquesne V. and Capron A. (1988) Induction of a protective antibody-dependent response against toxoplasmosis by *in vitro* excreted-secreted antigens from tachyzoites of *Toxoplasma gondii*. *Parasite Immun.* **10**, 553-567.
- Decoster A., Darcy F. and Capron A. (1988) Recognition of *Toxoplasma gondii* excreted-secreted antigens by human sera from acquired and congenital toxoplasmosis: identification of markers of acute and chronic infection. *Clin. exp. Immun.* **73**, 376-382.
- Dubey J. P. and Welcome F. L. (1988) *Toxoplasma gondii*-induced abortion in sheep. *JAVMA* **193**, 697-700.
- Duquesne V., Auriault C., Darcy F., Decavel J. P. and Capron A. (1990) Protection of nude rats against *Toxoplasma* infection by excreted-secreted antigens (ESA) specific helper T cells. *Infect. Immun.* **58**, 2120.
- Duquesne V., Auriault C., Gras-Masse H., Boutillon C., Darcy F., Cesbron-Delauw M. F., Tartar A. and Capron A. (1991) Identification of T cell epitopes within a 23 kD antigen (P24) of *Toxoplasma gondii*. *Clin. exp. Immun.* **84**, 527-534.
- Huynh T. V., Young R. A. and Davis R. W. (1985) Constructing and screening cDNA libraries in λ gt10 and λ gt11. In *DNA Cloning* (Edited by Glover D. M.) vol. 1, pp. 49-78. IRL Press, Oxford.
- Laemmli U. K. (1970) Cleavage of structural protein during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Leriche M. A. and Dubremetz J. F. (1991) Characterization of the protein contents of rhoptries and dense granules of *Toxoplasma gondii* tachyzoites by subcellular fractionation and monoclonal antibodies. *Molec. Biochem. Parasitol.* **45**, 249-260.
- McCabe R. and Remington J. P. (1988) Toxoplasmosis: the time has come. *N. Engl. J. Med.* **318**, 313-315.
- Merrifield R. B. (1963) Solid phase synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 2149-2154.
- Merrifield R. B. (1986) Solid phase synthesis. *Science* **232**, 341-347.
- Mitchell A. R., Erickson B. W., Ryabtev M. N., Hodges R. S. and Merrifield R. B. (1976) Tert-butoxycarbonyl-aminoacyl-4-(oxymethyl)-phenylacetamidomethyl-resin, a more acid-resistant support for solid-peptide synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **98**, 7357-7362.
- Muller S., Plavé S., Couppez M. and Van Regenmortel M. H. V. (1986) Comparison of different methods for localizing antigenic region in Histone H2A. *Molec. Immun.* **23**, 593-601.
- Palfreyman J. W., Aitchison T. C. and Taylor P. (1984) Guidelines for the production of polypeptide specific antisera using small synthetic oligopeptides as immunogens. *J. Immun. Meth.* **75**, 383-393.
- Pietta P. G. and Marshall R. G. (1970) Amide protection and amide supports in solid-phase peptide synthesis. *Chem. Comm.*
- Prince J. B., Araujo F. G., Remington J. S., Burg J. L., Boothroyd J. C. and Sharma S. D. (1989) Cloning of cDNA encoding a 28 kilodalton antigen of *Toxoplasma gondii*. *Molec. Biochem. Parasitol.* **34**, 3-14.
- Sharma S. D., Araujo F. G. and Remington J. S. (1984) *Toxoplasma* antigen isolated by affinity chromatography with monoclonal antibody protects mice against lethal infection with *Toxoplasma gondii*. *J. Immun.* **133**, 2818-2880.
- Sibley L. D. and Sharma S. D. (1987) Ultrastructural localization of an intracellular *Toxoplasma* protein that induces protection in mice. *Infect. Immun.* **55**, 2137-2141.
- Towbin H., Staehelin T. and Gordon J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedures and some applications. *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.* **76**, 4350-4354.

- Van Regenmortel M. H. V. (1986) Which structural features determine protein antigenicity? *TIBS* **11**, 36-39.
- Van Regenmortel M. H. V., Briand J. P., Muller S. and Plavé S. (1988) Synthetic polypeptides as antigens. *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, **19**, (Edited by R. H. Burton and P. H. Van Knippenberg). Elsevier, Amsterdam.
- Van Regenmortel M. H. V. (1989) Structural and functional approaches to the study of protein antigenicity. *Immun. Today* **10**, 266-272.
- Wehland J., Schröder H. C. and Weber K. (1984) Amino acid sequence requirements in the epitope recognized by the α -tubulin specific rat monoclonal antibody YL 1/2. *EMBO J.* **3**, 1295-1300.
- Westhof E., Altschuh D., Moras D., Bloomer A. C., Mondragon A., Klug A. and Van Regenmortel M. H. V. (1984) Correlation between segmental mobility and the location of antigenic determinants in proteins. *Nature* **311**, 123-124.

Multiple B-cell epitopes in a recombinant GRA2 secreted antigen of *Toxoplasma gondii*

AVRIL MURRAY, CORINNE MERCIER, ANNE DECOSTER, LAURENCE LECORDIER, ANDRÉ CAPRON and MARIE-FRANCE CESBRON-DELAUW

CIBP, INSERM UI67-CNRS624, Institut Pasteur, Lille, France

Received: 5th July, 1993

Summary

Two cDNA clones encoding the GRA2 (G.P.28.5) secreted antigen of *Toxoplasma gondii* were expressed in *Escherichia coli* as glutathione-S-transferase fusion polypeptides. A high level of expression was obtained for the first clone expressing the 59C-terminal amino acids of GRA2. The other one was an open-reading-frame of 212 amino acids containing the entire GRA2 cDNA. By ELISA, IgG antibodies directed against the 59aa recombinant polypeptide were detected in 33/44 (75%) sera from patients chronically infected with *T. gondii* and in 19/23 (82.6%) sera derived from patients with acute, primary toxoplasmosis. 10 of the 11 "chronic" sera which were negative by the 59aa ELISA were tested in an immunoblot against the 212aa open-reading-frame of GRA2: 8/10 were positive. A peptide representing the 15C-terminal amino acids of GRA2 has been shown to contain the epitope recognized by a mouse monoclonal antibody (TG17-179). The reactivity of human sera with the 59aa recombinant polypeptide was inhibited to varying degrees when the sera were co-incubated with this peptide. Twelve chronic sera showed a range of inhibition from 8 to 100% and twelve acute sera an inhibition range of 15 to 90%. This suggests that the 15aa C-terminal peptide contains an epitope recognized in both the acute and chronic phases of infection and that other major epitope(s) exist in the 59aa C-terminal region of GRA2. — As a conclusion, the recombinant GRA2 protein appears to contain at least three B-cell epitopes.

Introduction

Chronic infection with *T. gondii* in immunocompetent individuals leads to life-long immunity. With the aim of developing a subunit vaccine, many studies have been carried out to attempt identification of proteins which may elicit a protective response (SHARMA et al. 1984; SIBLEY & SHARMA 1987; DARCY et al. 1988). Studies using Excreted-Secreted Antigens (ESA) have shown that such an antigen preparation can protect mice against lethal infection (DARCY et al. 1988). The important role of the humoral response in protection was demonstrated by the survival of nu/nu rats infused with sera against ESA before infection (DARCY et al. 1988). Furthermore, a humoral response against ESA has been described in human toxoplasmosis (DECOSTER et al. 1988 a). The demonstrated immunogenicity and antigenicity of ESA has led to the cloning of their various components, with the aim of producing recombinant proteins which may be used both as vaccine and as standardized reagents in diagnostic tests.

One of these components is the GP28.5 ESA named GRA2 (SIBLEY et al. 1991) which, when used to immunize mice protects them against a challenge infection (SHARMA et al. 1984, CESBRON-DELAUW et al., unpublished data). One of the major epitopes of GRA2

has been previously defined, using a mouse monoclonal antibody TG17-179 (CHARIF et al. 1990): the minimal size for this epitope has been reported to correspond to the 8 C-terminal amino acids (aa) of the molecule (CESBRON-DELAUW et al. 1992).

This study further investigates the antigenicity of the GRA2 protein with respect to human sera, using two recombinant glutathione-S-transferase (GST) fusion polypeptides. The first one represents the 59 C-terminal aa of GRA2 (CESBRON-DELAUW et al. 1992) and the second one, an open-reading-frame of 212 amino acids found in the longest cDNA expressing clone (MERCIER et al. 1993). Combining ELISA and immunoblot techniques, we have shown that the rGRA2 contain at least 3 B-cell epitopes.

Materials and methods

Preparation of recombinant polypeptides

Two cDNA clones representing fragments of the GRA2 gene were subcloned into the pGEX-2T expression vector (Pharmacia, Saint-Quentin-Yvelines, France) (SMITH & JOHNSON 1988). The first clone, FM16 (430 bp), codes for the 59 C-terminal amino acids of GRA2 and the second one, L cDNA clone (892 bp) corresponds to the GRA2 open-reading-frame of 212 amino acids (CESBRON-DELAUW et al. 1992; MERCIER et al. 1993). Competent *E. coli* JM109 (Stratagene, La Jolla, CA, USA) were transformed by parental or recombinant 59aa and 212aa pGEX-2T DNA. Expression and purification of the recombinant GRA2 peptides in fusion with GST and of wild-type GST were carried out as previously described (SMITH & JOHNSON 1988). Briefly, a midlog-phase culture was stimulated 1 h at 37 °C with 0.1 mM IPTG. Cells were pelleted at 4,000 × g for 15 min. and resuspended in 0.02 M PBS pH 7.4, 0.5 mM PMSF, 1 mM EDTA, 1% Triton X100. Cells were lysed on ice by multiple rounds of sonication. The lysate was centrifuged at 10,000 × g for 10 min at 4 °C. The recombinant polypeptides were purified from the supernatant using glutathione-agarose beads as previously described (SMITH & JOHNSON 1988) and eluted by resuspending the beads in 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) containing 5 mM of free reduced glutathione. Aliquots of the products were analyzed by immunoblot (TOWBIN et al. 1979) using the anti-GRA2 monoclonal antibody TG17-179 (CHARIF et al. 1990) to verify the size of the produced fusion proteins. Concentration of the recombinant polypeptides were determined by a quantitative silver nitrate gel using BSA as standard (data not shown).

Human sera

191 human sera were used in these experiments, representing the 3 stages of immunological status. Chronic sera were defined by the presence of IgG and the absence of IgA and IgM antibodies, as detected using "PLATELIA IgG, IgA and IgM" kits (Diagnostics Pasteur, Marnes-la-Coquette, France). Acute sera were defined by the presence of anti-P30 IgM and IgA antibodies (Diagnostics Pasteur "PLATELIA IgA and IgM" kits) (DECOSTER et al. 1988b). Negative controls consisted of sera which were tested negative for specific anti-toxoplasmic antibodies, using the assays described above.

Indirect ELISA on the 59aa fusion polypeptide

Microtiter plates (Greiner GmbH, Nürtingen, Germany) were coated overnight at 4 °C with 100 µl of the purified 59aa fusion polypeptide (or a matched quantity of purified wild-type GST as control) diluted in sodium phosphate buffer (0.1 M pH 7.2). The optimum antigen dilution corresponded to approximately 0.4 µg/ml. The plates were washed twice with 0.01 M PBS pH 7.2–0.05% Tween 20 (Merck, Darmstadt, Germany), blocked with 200 µl 5% skim milk powder diluted in PBS for 1 h at room temperature. After washing, 100 µl of serum (1:50 dilution) were added to each well for

1 h at 22–24 °C. The diluent was 5% dried milk diluted in PBS containing a 1% *E. coli* (JM109 strain) crude extract which derived from a saturation culture lysed by sonication. After washing, 100 µl of anti-human IgG (H + L)-biotinylated antibody (Amersham plc., Amersham, U.K.) diluted 1:4,000 in PBS-5% milk were added to the wells. After 1 h incubation at room temperature, the plates were washed and developed for an half-hour at room temperature with 100 µl of peroxidase-conjugated streptavidin-biotin complexes (Amersham) diluted 1:4,000 in PBS-0.25% gelatin. Finally, the plates were revealed for 30 min using O-Phenylenediamine Dihydrochloride (Sigma, Saint-Quentin-Fallavier, France). The absorbance was measured at 492 nm in a Titertek Multiskan MCC/340 (Flow, Les Ullis, France) and the A₄₉₂ for each test was expressed as follows: O.D.₄₉₂ of serum reacting with 59aa – O.D.₄₉₂ of serum reacting with GST.

Inhibition experiments

We further tested the ability of a synthetic peptide (corresponding to the 15C-terminal amino acids of GRA2) to inhibit the reactivity of both acute and chronic human sera with the 59aa recombinant polypeptide. Sera were tested using the same ELISA conditions described above. The peptide was added to the serum diluent at a final concentration of 1 µg/ml or 10 µg/ml. The percentage inhibition was calculated as follows:

$$\frac{\text{O.D.}_{492} \text{ in standard diluent} - \text{O.D.}_{492} \text{ in the presence of inhibiting peptide}}{\text{O.D.}_{492} \text{ in standard diluent}} \times 100$$

An irrelevant peptide corresponding to amino acids 213 to 230 of SAG1, the P30 surface antigen of *T. gondii* (BURG et al. 1988; SIBLEY et al. 1991) was used to test the specificity of the inhibition. This peptide was added to the serum diluent to give a final concentration of 10 µg/ml.

Immunoblotting

The reactivity of human sera with the recombinant 212aa polypeptide was investigated by immunoblot. The 212aa fusion polypeptide was produced from 1 liter of transformed *E. coli*, concentrated to 400 µl, loaded on a 10% SDS-miniPAGE (Bioblock Scientific, Illkirch, France) and electroblotted onto nitrocellulose. Sera were diluted 1:40 in 0.01 M PBS pH 7.2 containing 5% powdered milk and 1% *E. coli* extract. After 3 h incubation at room temperature, the nitrocellulose strips were washed and incubated for 1 h (room temperature) with biotinylated anti-human IgG (H + L) antibodies (Amersham) diluted 1:400 in PBS-5% powdered milk. Peroxidase-conjugated streptavidin/biotin complexes (Amersham) were diluted 1:400 in 0.1 M PBS pH 7.2 containing 0.25% gelatin and 1% Tween 20, incubated with the strips for 30 mn (room temperature) and developed using 4-chloro-1-Naphtol (Sigma) for 30 mn.

Results

Production of recombinant polypeptides

The FM16 and L cDNA clones which were described in our previous works (CESBRON-DELAUW et al. 1992; MERCIER et al. 1993) were subcloned into the pGEX-2T, at the BamHI-SmaI and at the SmaI restriction sites respectively. The 430 bp of the FM16 and the 895 bp of the L cDNA clones let to produce fusion products with GST of approximately 32 and 50 kDa respectively. Figure 1 illustrates the relative levels of expression of the two recombinant polypeptides. Despite some degradations, very high yields of the fusion peptide of 32 kDa which corresponds to the 59C-terminal amino acids of GRA2 were obtained (Lane A). However, the production in the same pGEX system of the 212aa

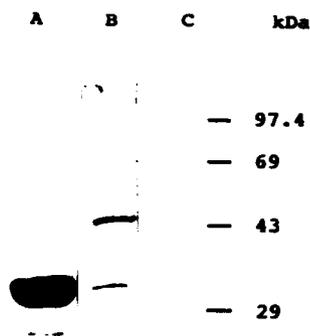


Figure 1. Relative expression of the 59aa and 212aa fusion polypeptides. Recombinant antigens expressed in *E. coli* (pGEX-2T vector) were submitted to a 10% SDS-miniPAGE, electroblotted onto nitrocellulose and probed with the anti-GRA2 monoclonal antibody TG17-179 (CHARIF et al., 1990). Lanes A and B: 30 μ l of the 59aa and 212aa fusion polypeptides respectively obtained from a 1 liter of induced culture eluted in a final volume of 5 ml. Lane C corresponds to 3 μ l of GST expressed in the same conditions.

deduced of the open-reading-frame of GRA2 gave very low yields which appeared to be due to degradation of the fusion polypeptide (Lane B).

Reactivity of IgG in human sera with recombinant polypeptides

The 59aa recombinant polypeptide was applied to an ELISA system to measure human IgG antibodies recognized this polypeptide. Sera were tested against GST (produced in

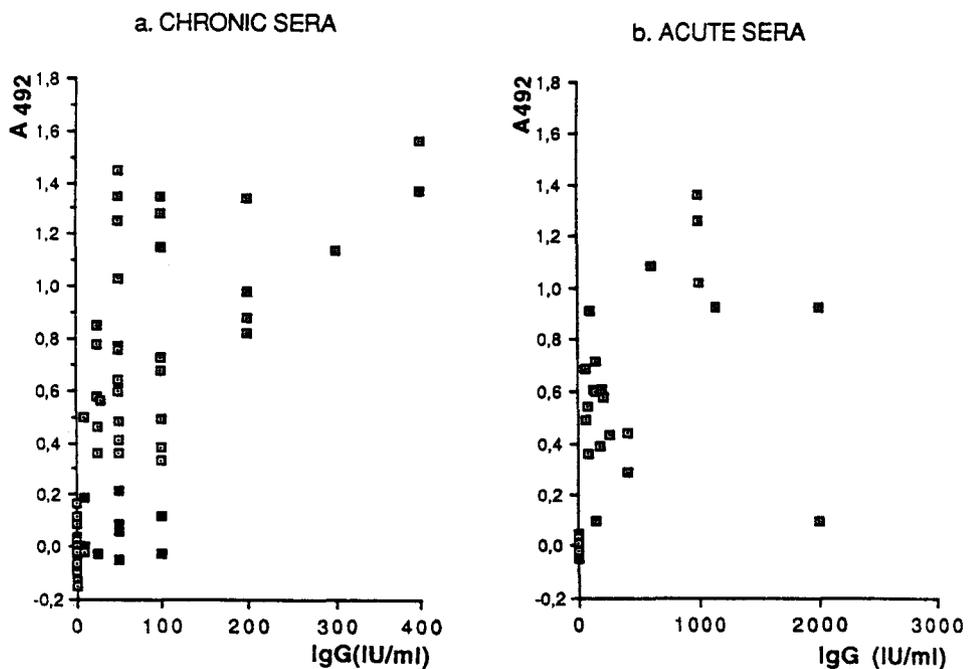


Figure 2. IgG ELISA of 44 chronic (a) and 23 acute (b) human sera on the 59aa recombinant polypeptide.

The X axis indicates the IgG titers (IU/ml) of the tested sera, as defined by conventional tests (see "Materials and Methods"). The Y axis indicates A_{492} . Black symbol indicate positive sera for IgG in the conventional ELISA tests but negative for the 59aa ELISA.

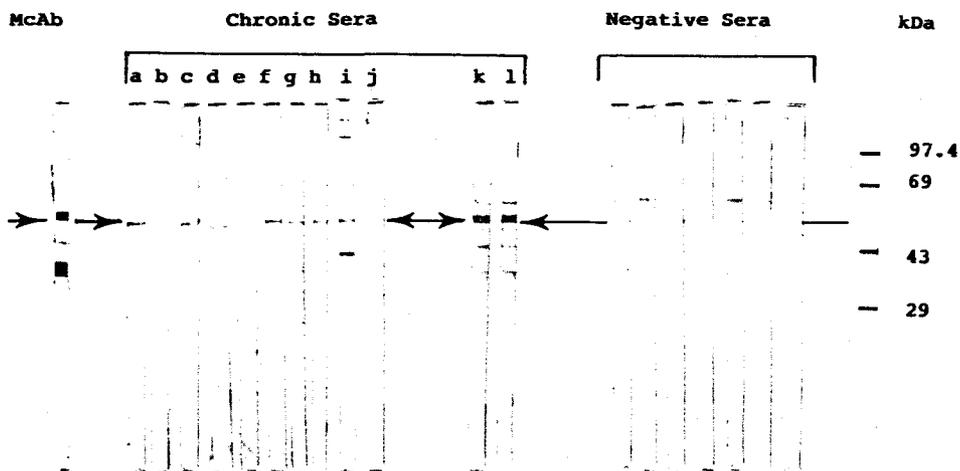


Figure 3. Reactivity of human sera with GST-fusion polypeptide representing 212aa of GRA2 on an immunoblot.

Recombinant fusion polypeptide corresponding to 212aa of GRA2 was submitted to a SDS-miniPAGE, electroblotted onto nitrocellulose and probed with different antisera. As a positive control, the recombinant antigen was revealed with the anti-GRA2 monoclonal antibody TG17-179 ("McAb"). Among the 12 chronic sera (defined in "Materials and Methods") tested ("Chronic sera"), 10 were negative in ELISA (Table 1) for the reactivity against the 59aa C-terminal fusion polypeptide (lanes a to j) and 2 were positive in the same test (lanes k and l). The reactivity of 7 negative sera was tested to this recombinant antigen ("Negative sera").

the same pGEX system) in parallel with the recombinant polypeptide. The average O.D.₄₉₂ against GST was 0.15 and no difference was observed between the reactivity of sera from *Toxoplasma* infected individuals and from *T. gondii* negative sera (data not shown).

No sufficient yield of the 212aa recombinant polypeptide was obtained to carry out extensive ELISA experiments. Therefore, selected sera (see below) were tested in an immunoblot for IgG antibodies against this protein.

Chronic sera: 44 chronic sera were tested for IgG anti-59aa antibodies (Fig. 2a) and 92 sera, negative in conventional tests for *T. gondii* (see Materials and Methods), were tested in parallel. The mean of $A_{492} + 3sd$ for the negative sera was 0.23. This value was used as the cut-off for seropositivity. 33/44 (75%) of the chronic sera were above this value and all negative sera were under this value, demonstrating a 100% specificity for this 59aa ELISA. The correlation with the conventional ELISA test for *Toxoplasma* antibodies was $r = 0.7$ p. Despite this correlation, patients with 50–100 IU/ml IgG anti-*T. gondii* antibodies showed a wide range of antibody levels against the 59aa recombinant polypeptide, ranging in A_{492} from 0.35 to 1.5 (Fig. 2a). Therefore, a homogenous level of anti-total *T. gondii* antigen may hide a varied response to GRA2.

10 chronic sera which were negative in ELISA against the 59aa recombinant polypeptide were tested on an immunoblot against the 212aa. 8/10 reacted with this fusion protein (Fig. 3) compared with 0/7 negative controls. These sera may thus recognize epitopes within the N-terminal amino acids of GRA2.

Acute sera: 23 acute sera (defined as described in Materials and Methods by the presence of both IgM and IgA antibodies) were tested for anti-59aa IgG antibodies (Fig. 2b). 19/23 (82.6%) of the acute sera showed an A_{492} greater than 0.23 (Fig. 2b). No difference in absorbances was observed for chronic versus acute sera ($P = 0.5$).

Reactivity of sera with the 15aa C-terminal peptide of GRA2

The 15C-terminal amino acids of GRA2 have been shown to represent the epitope recognized by a mouse monoclonal antibody TG17-179 (CHARIF et al. 1990) in both solid and liquid phase assay (CESBRON-DELAUW et al. 1992). We were however unable to show reactivity of human sera with this peptide used to coat the ELISA wells (data not shown). We further tested the ability of this synthetic peptide to inhibit the reactivity of both acute and chronic human sera with the 59aa recombinant polypeptide ELISA. The results are shown in Figure 3. Both chronic and acute sera were inhibited to varying extents by the 15aa synthetic peptide. For the chronic sera, the percentage inhibition ranged from 8 to 100% and did not correlate with the starting A_{492} (Table 1). The low inhibition observed for some sera may be due to antibodies of low affinity against this

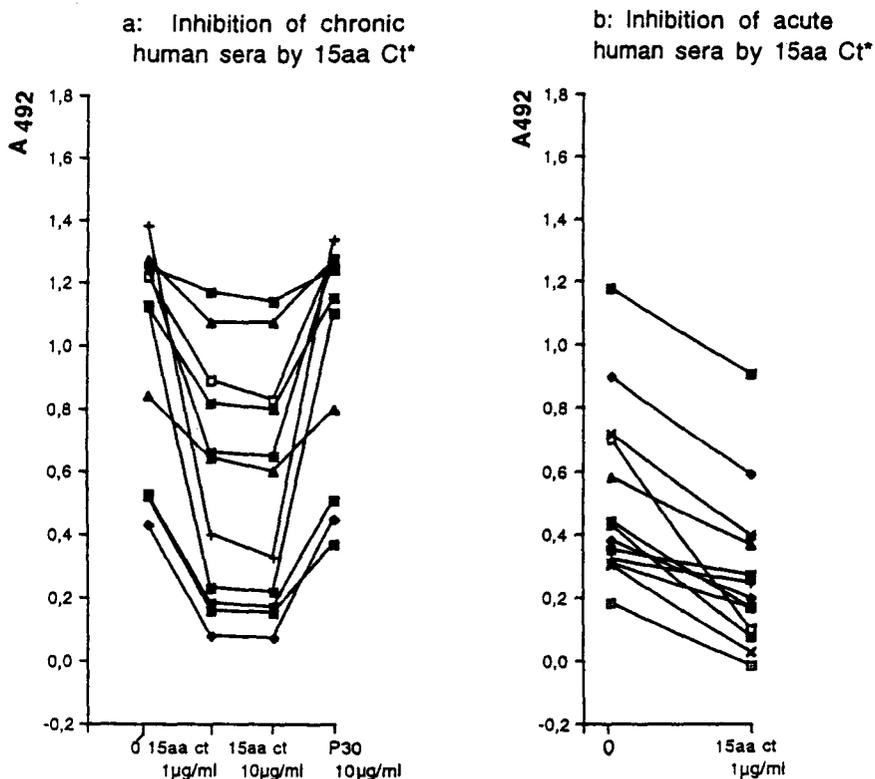


Figure 4. Inhibition of reactivity of human sera with the 59aa fusion polypeptide by the 15aa C-terminal synthetic peptide of GRA2 (15aa ct) and by a 15aa P30 peptide (see Materials and Methods).

The concentration of inhibiting peptides is indicated on the X axis whereas the Y axis represents the A_{492} . 11 chronic (Part a) and 13 acute sera (Part b) were tested.

Table 1. Inhibition of anti-59aa IgG antibodies by the 15aa C-terminal synthetic peptide.

Chronic sera		Acute sera	
OD 59aa	% inhibition ^o by 15aa ct	OD 59aa	% inhibition ^o by 15aa ct
1.23	80	1.18	23
1.15	17	0.90	34
1.08	31	0.72	44
1.02	88	0.70	86
1.02	8	0.58	36
0.98	55	0.44	61
0.93	32	0.43	81
0.68	29	0.38	15
0.64	50	0.35	23
0.52	69	0.32	22
0.38	92	0.31	41
0.34	100	0.30	90

The 15aa C-terminal peptide of GRA2 (15aa ct) was used at the concentration of 1 µg/ml. No significant difference (^o) was observed between the inhibition percentage of acute and chronic sera ($P = 0.5$).

peptide. However, increasing the peptide concentration 10 fold did not increase the inhibition of chronic sera (Figure 3a). The specificity of inhibition was demonstrated by the complete absence of inhibition observed using a P30 peptide of similar length (Figure 3a).

Similarly, the range of inhibition of the acute sera was 15–90% and was also independent of starting A_{492} (Table 1). Therefore, the polyclonal response to GRA2 involves a reactivity with the 15aa C-terminal peptide, the extent of which varies between individuals. In addition, the extent of this response does not apparently change between acute and chronic infection since no difference in the inhibition percentages was observed for each group ($P = 0.5$, Table 1).

Discussion

The potential of recombinant proteins and polypeptides as the basis of vaccines and diagnostic tests has stimulated the search for B- and T-cell epitopes of various infectious agents. The application of recombinant proteins and peptides to diagnosis of viral diseases is at an advanced stage; this is particularly evidenced by HIV infection. Recombinant proteins for the diagnosis of parasitic infections are also emerging. Two recent studies reported recombinant proteins applicable to the diagnosis of *Schistosoma mansoni* and *Echinococcus multilocularis* (XU et al. 1991; MULLER et al. 1989). Recent advances in the production in *E. coli* of recombinant proteins as highly soluble GST-fusion proteins has facilitated the expression and purification of whole and fragments of recombinant proteins (SMITH & JOHNSON 1988). Two groups have reported GST-fusion proteins of *T. gondii* which may be of use in diagnosis of acute and chronic infection (TENTER & JOHNSON 1991 and JOHNSON & ILLANA 1991; PARMLEY et al. 1992).

We have used this pGEX system to investigate the human B-cell epitopes of the *T. gondii* GRA2 antigen (PRINCE et al. 1989; PARMLEY et al. 1993; MERCIER et al. 1993) in view of diagnostic and protective applications.

Some degradations of the expressed fusion polypeptides were observed. The presence of PEST sequences (ROGERS et al. 1986) rich in proline, glutamic acid, serine and threonine residues, in the middle and the C-terminal of GRA2 could explain the extreme sensitivity of the GRA2 polypeptide to proteases. Moreover, the fact that HPLC purification of the native antigen could be easily obtained (MERCIER et al. 1993) may indicate that (O)-glycosylation(s) and perhaps phosphorylation(s) of these GRA2 peptidic fragments may protect the native antigen against protease degradations.

Very high yields of fusion protein were obtained when a cDNA clone representing the 59 C-terminal amino acids of GRA2 (CESBRON-DELAUW et al. 1992) was expressed. In order to investigate the presence of other B-cell epitopes in the N-terminal region, the entire open-reading-frame of 212aa (L cDNA clone, MERCIER et al. 1993) was expressed in the same pGEX system. The recombinant fusion polypeptide was poorly expressed, certainly due to the presence of the hydrophobic signal peptide in this construction (MERCIER et al. 1993). The high level of expression of the 59aa C-terminal amino acids of GRA2 enabled the setting-up of an ELISA and the screening of sera from individuals with either acute or chronic toxoplasmic infection. The observation that 82.6% of 23 acute and 75% of 44 chronic sera tested were positive in the ELISA indicates that major epitope(s) exist in this region. A peptide corresponding to the 15 C-terminal amino acid residues of this antigen has previously been found to contain the epitope recognized by a mouse monoclonal antibody TG17-179 (CHARIF et al. 1990) in both liquid and solid phase assays (CESBRON-DELAUW et al. 1992). In this study, we have further defined the reactivity of human sera against this peptide. Initial studies failed to demonstrate a reactivity of human sera with this peptide on the solid phase (data not shown), suggesting that the liquid phase conformation is required for recognition of this epitope by human sera. The inhibition studies described here demonstrate that a gradation of the antibody response to this peptide is observed among infected individuals. This peptide thus represents the major epitope of the 59aa C-terminal region of GRA2, recognized by about one third of the acute and chronic toxoplasmic sera (80% of inhibition) whereas another one third showed 35–80% of inhibition. The intensity of the response does not correlate with the stage of infection.

The fact that some sera showed levels of inhibition < 35% demonstrates that other major B cell epitope(s) exist in the 59aa C-terminal region of GRA2. However, the demonstration that sera, negative against the 59aa fusion polypeptide, reacted with the 212aa one suggests that other N-terminal epitope(s) are recognized by human sera. The polyclonal response to GRA2 in human infection appears to involve multiple major epitopes which are maintained in truncated recombinant polypeptides expressed in *E. coli* and are therefore probably linear epitopes, not depending of the glycosylation status of this antigen (SHARMA et al. 1984; DARCY et al. 1988; CHARIF et al. 1990; ACHBAROU et al. 1991). Computer prediction of B-cell epitopes by sequential analysis of 6aa peptide windows along the 185aa length of GRA2 revealed two regions which peak in hydrophobicity, mobility, and flexibility. These regions correspond to amino acids 55–70 and amino acids 140–160. A recombinant peptide representing the N-terminal 75 amino acids of GRA2 may prove to contain sufficient B-cell epitopes to give a more sensitive ELISA antigen. The reactivity of sera with synthetic peptides corresponding to the predicted epitopes will also be of interest.

In conclusion, this study demonstrates the antigenicity of a recombinant ESA protein (GRA2) for human toxoplasmic sera. The polyclonal response to GRA2 includes recognition of the previously described 15aa C-terminal epitope by both acute and chronic

sera but also demonstrates that other B-cell epitopes exist in the protein. These findings should further intensify attempts to produce large quantities of a GRA2 recombinant protein in order to pursue the epitope mapping. Synthetic or recombinant antigenic peptides derived from other GRA cDNA deduced proteins (CESBRON-DELAUW et al. 1989; MEVELEC et al. 1992; LECORDIER et al. 1993; LECORDIER et al., in preparation) could also be tested to enhance the sensitivity and the specificity of the actual diagnostic ELISA tests for toxoplasmosis.

Acknowledgements

The authors are grateful to Drs. C. AURIAULT, G. E. GARBER and R. J. PIERCE for critically reading the manuscript and to Dr. C. VERWAERDE for helpful discussions. They also acknowledge C. DROLEZ for iconography. This work was funded by INSERM U167, CNRS 624 and Institut Pasteur de Lille. A. MURRAY was supported by a post-doctoral grant of Diagnostics Pasteur.

References

- ACHBAROU, A.; MERCEREAU-PUJALON, O.; SADAK, A.; FORTIER, B.; LERICHE, M. A.; CAMUS, D.; DUBREMETZ, J. F. (1991): Differential targeting of dense granule proteins in the parasitophorous vacuole of *Toxoplasma gondii*. — *Parasitology* **103**: 321–329.
- BURG, J. L.; PERELMAN, D.; KASPER, L.; WARE, P. L.; BOOTHROYD, J. C. (1988): Molecular analysis of the gene encoding the major surface antigen of *Toxoplasma gondii*. — *J. Immunol.* **141**: 3584–3591.
- CESBRON-DELAUW, M. F.; GUY, B.; TORPIER, G.; PIERCE, R. J.; LENZEN, P.; CESBRON, J. Y.; CHARIF, H.; LEPAGE, P.; DARCY, F.; LECOCQ, J. P.; CAPRON, A. (1989): Molecular characterization of a 23 kDa major antigen secreted by *Toxoplasma gondii*. — *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 7537–7541.
- BOUTILLON, C.; MERCIER, C.; FOURMAUX, M. P.; MURRAY, A.; MIQUEY, F.; TARTAR, A.; CAPRON, A. (1992): Amino acid sequence requirements for the epitope recognized by a monoclonal antibody reacting with the secreted antigen GP28.5 of *Toxoplasma gondii*. — *Mol. Immunol.* **29**: 1375–1382.
- CHARIF, H.; DARCY, F.; TORPIER, G.; CESBRON-DELAUW, M. F.; CAPRON, A. (1990): *Toxoplasma gondii*: characterization and localization of antigens secreted from tachyzoites. — *Exp. Parasitol.* **71**: 114–124.
- DARCY, F.; DESLÉE, D.; SANTORO, F.; CHARIF, H.; AURIAULT, C.; DECOSTER, A.; DUQUESNE, V.; CAPRON, A. (1988): Induction of a protective antibody-dependent response to toxoplasmosis by in vitro excreted/secreted antigens from tachyzoites of *Toxoplasma gondii*. — *Parasite Immunol.* **10**: 553–567.
- DECOSTER, A.; DARCY, F.; CAPRON, A. (1988a): Recognition of *Toxoplasma gondii* excreted and secreted antigens by human sera from acquired and congenital toxoplasmosis: identification of markers of acute and chronic infection. — *Clin. Exp. Immunol.* **73**: 376–382.
- DARCY, F.; CARON, A.; CAPRON, A. (1988b): IgA antibodies against P30 as markers of congenital and acute toxoplasmosis. — *Lancet* **12**: 1104–1108.
- JOHNSON, A. M.; ILLANA, S. (1991): Cloning of *Toxoplasma* gene fragments encoding diagnostic antigens. — *Gene* **99**: 127–132.
- LECORDIER, L.; MERCIER, C.; TORPIER, G.; TOURVIELLE, B.; DARCY, F.; LIU, J.; MAES, P.; TARTAR, A.; CAPRON, A.; CESBRON-DELAUW, M. F. (1993): Molecular structure of a *Toxoplasma gondii* dense granule antigen (GRA5) associated with the parasitophorous vacuole membrane. — *Mol. Biochem. Parasitol.* **59**: 143–154.
- MERCIER, C.; LECORDIER, L.; DARCY, F.; DESLÉE, D.; MURRAY, A.; TOURVIELLE, B.; MAES, P.; CAPRON, A.; CESBRON-DELAUW, M. F. (1993): *Toxoplasma gondii*: molecular characterization of a dense granule antigen (GRA2) associated with the network of the parasitophorous vacuole. — *Mol. Biochem. Parasitol.* **58**: 71–82.
- MEVELEC, M. N.; CHARDÈS, T.; MERCEREAU-PUJALON, O.; BOURGUIN, I.; ACHBAROU, A.; DUBREMETZ, J. F.; BOUT, D. (1992): Molecular cloning of GRA4, a *Toxoplasma gondii* dense granule protein recognized by mucosal IgA antibodies. — *Mol. biochem. Parasitol.* **56**: 227–238.
- MULLER, N.; GOTTSTEIN, B.; VOGEL, M.; FLURY, K.; SEEBECK, T. (1989): Application of a recombinant *Echinococcus multilocularis* antigen in an enzyme-linked immunosorbent assay for immunodiagnosis of human alveolar echinococcosis. — *Mol. Biochem. Parasitol.* **36**: 151–159.



- PARMLEY, S. F.; SGARLATO, G. D.; MARK, J.; PRINCE, J. B.; REMINGTON, J. S. (1992): Expression, characterization and serologic reactivity of recombinant surface antigen P22 of *Toxoplasma gondii*. – J. Clin. Microbiol. **30**: 1127–1133.
- REMINGTON, J. S. (1993): Genomic and corrected cDNA sequence of the P28 gene from *Toxoplasma gondii*. – Mol. Biochem. Parasitol. **57**: 161–166.
- PRINCE, J. B.; ARAUJO, F. G.; REMINGTON, J. S.; BURG, J. L.; BOOTHROYD, J. C.; SHARMA, S. D. (1989): Cloning of cDNAs encoding a 28 kilodalton antigen of *Toxoplasma gondii*. – Mol. Biochem. Parasitol. **34**: 3–14.
- ROGERS, S.; WELLS, R.; RECHSTEINER, M. (1986): Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. – Science **234**: 304–308.
- SHARMA, S. D.; ARAUJO, F. G.; REMINGTON, J. S. (1984): *Toxoplasma* antigen isolated by affinity chromatography with monoclonal antibody protects mice against lethal infection with *Toxoplasma gondii*. – J. Immunol. **133**: 2818–2820.
- SIBLEY, L. D.; SHARMA, S. D. (1987): Ultrastructural localization of an intracellular *Toxoplasma* protein that induces protection in mice. – Infect. Immun. **55**: 2137–2141.
- PFEFFERKORN, E. R.; BOOTHROYD, J. C. (1991): Proposal for a uniform genetic nomenclature in *Toxoplasma gondii*. – Parasitol. Today **7**: 327–328.
- SMITH, D. B.; JOHNSON, K. S. (1988): Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase-Gene. – **67**: 31–40.
- TENTER, A. M.; JOHNSON, A. M. (1991): Recognition of recombinant *Toxoplasma gondii* antigens by human sera in an ELISA. – Parasitol. Res. **77**: 197–203.
- TOWBIN, H.; STAHELIN, T.; GORDON, J. (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedures and some applications. – Proc. natn. Acad. Sci. USA. **76**: 4350–4354.
- XU, H.; REKKOSH, D. M.; ANDREWS, W.; HIGASHI, G. I.; NICHOLSON, L.; LOVERDE, P. T. (1991): *Schistosoma mansoni* tropomyosin: production and purification of the recombinant protein and studies on its immunodiagnostic potential. – Am. J. Trop. Med. Hyg. **45**: 121–131.

Authors' address: Dr. A. MURRAY, Cambridge Biotech., Parkmore Industrial Estate, Tuam Road, Galway, Ireland; Dr. C. MERCIER, Dr. L. LECORDIER, Prof. Dr. A. CAPRON and Dr. M.-F. CESBRON-DELAUW, CIBP, INSERM UI67-CNRS 624, Institut Pasteur, 1 rue Pr. A. Calmette, 59019 Lille, France; Dr. A. DECOSTER, Hôpital Saint-Vincent, 59000 Lille, France.

Reprint requests: Dr. M. F. CESBRON-DELAUW, CIBP, INSERM U167-CNRS 624, Institut Pasteur, 1 rue du Pr. A. Calmette, BP 245, 59019 Lille, France. Phone: (33) 20877783, Fax: (33) 20877888.

Book review

IAEA Yearbook 1992 (1992). – Vienna (International Atomic Agency); 299 pp., 49 Figs., 37 Tab., Lit. nach jedem Beitrag; brosch. 500 Österr. Schill.

Das vorliegende Jahrbuch ist vornehmlich dem Thema Kernkraft-Sicherheit gewidmet. So werden einleitend, aus der Sicht der IAEA, die Reaktorsicherheit in Osteuropa eingeschätzt und zum Knowhow-Transfer im Jahre 1991 sowie zur vermehrten Anwendung der Strahlen-Technologie in Asien Stellung genommen. Neben einer detaillierten Übersicht zur Reaktorsicherheit (100 pp.) wird eine zusammenfassende Darstellung des Gebietes Kernkraft/Zyklus atomarer Brennstoffe/Management der atomaren Abfälle (85 pp.) gegeben. Biologisch-parasitologisch relevante Themen sind die erfolgreiche Ausrottung von *Cochliomyia hominivorax* in Libyen (straff organisiertes Programm unter Einsatz steriler Fliegen – 40 Mio/Woche, Verhältnis sterile zu „Wild“ Fliegen = 100 : 1, metataphylaktische Wundbehandlungen, sorgfältige Überwachung der Haustierpopulation, Kontrolle des Erfolges, internationale Zusammenarbeit, Kosten (80 Mio US-Dollar) : Nutzen = 1 : 5 (betroffenes Gebiet), 1:10 (Libyen) und 1:50 (N-Afrika), neue Wege zum effektiveren Einsatz von Pestiziden und die vermehrte Anwendung von Radiopharmazeutika. Im Anhang werden die Ausgaben für Forschungsprogramme 1991 aufgelistet; von 5,4 Mio US-Dollar entfielen auf das Gebiet Nahrungsgüter/Landwirtschaft 2,2 Mio.

G. ILCHMANN (Berlin)

III- IDENTIFICATION DU PROMOTEUR DE TRANSCRIPTION DES GENES *GRA1*, *GRA2*, *GRA5* ET *GRA6*

- p. 102: **Mol. Cell. Biol.**, manuscrit en préparation

La seconde partie de notre travail consistait à mettre en évidence le promoteur de transcription du gène *GRA2*.

Disposant au laboratoire de 4 gènes codant pour des protéines toxoplasmiques présentant un profil d'expression et de sécrétion similaires (antigènes communs aux stades tachyzoïte et bradyzoïte, sécrétés dans la vacuole parasitophore après l'invasion de la cellule-hôte), nous pouvions émettre l'hypothèse que l'expression de ces 4 protéines pouvait être initiée par des signaux similaires, si ce n'est identiques. Aussi, l'étude des promoteurs fut-elle menée en parallèle sur les 4 gènes *GRA1* (Cesbron-Delauw, Guy et al., 1989), *GRA2* (Mercier, Lecordier et al., 1993), *GRA5* (Lecordier, Mercier et al., 1993) et *GRA6* (Lecordier, Dubremetz et al., in preparation).

Bien que bon nombre de gènes codant pour des protéines de surface, de sécrétion (rhoptries ou granules denses) ou pour des "enzymes de ménage" soient maintenant clonés, les régions promotrices de ces gènes n'ont pas été caractérisées jusqu'à ce jour. L'analyse des régions 5' des gènes publiés, y compris celles des gènes *GRA* (hormis *GRA1*) n'a pas permis de mettre en évidence de séquence consensus classique initiateur de transcription (TATA- ou CAAT-box). Seule caractéristique commune à tous ces gènes, le pourcentage en G+C des régions 5' flanquantes est toujours au moins $\geq 55\%$, ceci en comparaison avec les régions 5' et 3' transcrites non traduites dont le G+C% est $\leq 53\%$ (Lecordier, Dubremetz et al., in preparation). Des séquences riches en motifs "GC" ont d'ailleurs été rapportées dans ces régions 5' flanquantes mais sans homologie apparente avec les séquences promotrices déjà décrites dans la littérature (Cesbron-Delauw, Guy et al., 1989; Mercier, Lecordier et al., 1993; Lecordier, Mercier et al., 1993; Lecordier, Dubremetz et al., in preparation).

Afin de caractériser les séquences génomiques promotrices de transcription, nous avons mis à profit les récents progrès acquis dans le domaine de la manipulation génétique du Toxoplasme (Soldati and Boothroyd, 1993; Kim, Soldati et al., 1993). Nous avons en effet utilisé le système de transfection transitoire des tachyzoïtes décrit récemment par Soldati and Boothroyd (Soldati and Boothroyd, 1993) : un plasmide contenant un gène indicateur bactérien CAT (codant pour l'enzyme Chloramphénicol Acétyl Transférase), lui-même sous la dépendance des régions 5' *GRA*, a été introduit dans les parasites par électroporation. L'activité de l'enzyme CAT a été mise en évidence ou dosée après 20 heures de culture.

Les résultats obtenus ont montré que les régions 5' des gènes *GRA* donnent naissance à des activités CAT importantes, *GRA1* permettant par exemple une activité 4 fois plus importante que la région 5' *SAG1* précédemment décrite (Soldati and Boothroyd, 1993).

La construction de mutants de délétion à partir des régions génomiques 5' flanquantes initialement amplifiées par PCR a permis de localiser assez précisément les éléments responsables de l'initiation de la transcription de chaque gène *GRA* et de définir la région promotrice. Les 70 pb situées en amont du site de démarrage de la transcription du gène *GRA1* se sont ainsi révélées nécessaires à une efficacité de transcription optimale du gène ; les 65 pb, 30 pb et 54 pb situées respectivement en amont du "cap site" des gènes *GRA2*, *GRA5* et *GRA6* se sont quant à elles, révélées indispensables pour une transcription optimale des gènes correspondants.

L'analyse de la séquence des régions promotrices des 4 gènes *GRA* étudiés a mis en évidence la présence d'un motif de 7 pb ("A/TGAGACG") répété ; ce motif semble également présent en amont d'autres gènes toxoplasmiques. Le rôle de ces motifs dans l'initiation de la transcription des gènes *GRA* considérés est donc suspecté.

L'influence sur l'activité CAT des régions 5' transcrites mais non traduites a également été recherchée. En effet, le rôle de ces régions particulièrement riches en T dans la stabilité des messages a été évoqué (Cesbron-Delauw, Mercier et al., 1993; Cesbron-Delauw, soumis). Des constructions "hybrides", juxtaposant au niveau du "cap site", la région 5' flanquante de *GRA1* (activité CAT la plus importante) avec la région 5' transcrite non traduite de *GRA6* (activité CAT la plus faible) ou la région 5' flanquante de *GRA6* avec la région 5' transcrite non traduite de *GRA1* ont ainsi été réalisées. La transfection de ces constructions "hybrides", en comparaison des constructions *GRA1* et *GRA6* "originales" permet d'induire une activité CAT intermédiaire, plus forte que celle générée par la construction initiale de *GRA6* mais plus faible que celle générée par la construction initiale de *GRA1*. Ces résultats suggèrent donc que la région 5' transcrite non traduite des gènes *GRA* considérés influence l'activité CAT détectée. La longueur de cette région ne semble pas en cause puisque une région de 200 pb environ donne naissance à une activité CAT importante pour *GRA1* ou très faible pour *GRA6*. La présence d'une séquence amplificatrice ("enhancer") dans la région 5' non traduite de *GRA1* ou d'une région modératrice ("silencer") dans la région 5' non traduite de *GRA6* ne peut pas être exclue. La composition en bases et donc la structure tridimensionnelle de ces régions pourraient également être responsables de l'accessibilité de l'ARNm aux ribosomes ou encore de la stabilité du message produit. Ces régions pourraient donc à la fois jouer un rôle au niveau de la transcription mais également au niveau de la traduction du gène.

Title: CIS-ACTING ELEMENTS IN THE PROMOTER REGIONS OF 4 GENES ENCODING DENSE GRANULE PROTEINS IN *TOXOPLASMA GONDII*

(Running title : promoter of *T. gondii* GRA genes)

Authors: Corinne MERCIER¹, Gary E. GARBER², Laurence LECORDIER¹, Patrick BEAUCHAMPS¹, André CAPRON¹ and Marie-France CESBRON-DELAUW^{1*}

Institution: Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire, Institut Pasteur de LILLE, FRANCE

Addresses: 1: CIBP, INSERM U167-CNRS 624, Institut Pasteur de LILLE (FRANCE) ; 2: Division of Infectious Diseases, Ottawa General Hospital, Ottawa, Ontario (CANADA).

Corresponding author: * Dr. M.F. Cesbron-Delauw. Unité INSERM "Pathogénèse du SIDA et des Infections à Tropisme Immunitaire et Nerveux" (Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire), Institut Pasteur de Lille, 1 rue du Pr. A. Calmette, BP245, 59019 LILLE Cédex. (FRANCE). Tel: (33) 20. 87. 79. 60. Fax number: (33) 20. 87. 78. 88.

Footnote: Nucleotide sequences reported in this paper refer to the GenbankTM data base accession numbers L01753, L06091, M26007.

SUMMARY

The *GRA* genes of *Toxoplasma gondii* encode a family of dense granule proteins that are secreted in the parasitophorous vacuole space and/or membrane after invasion of the host-cell. When placed upstream from the Chloramphenicol Acetyl Transferase reporter gene, the 5' regions of the *GRA1* (379 bp), *GRA2* (276 bp), *GRA5* (209 bp) and *GRA6* (265 bp) genes, are sufficient to cause production of CAT in a *T. gondii* transient transformation assay. Deletion analysis revealed that the essential regions for the promoter activities reside within the proximal region of each gene: -107 to -47 for *GRA1*, -73 to -37 for *GRA2*, -51 to -13 for *GRA5* and -85 to -27 for *GRA6*. These promoter regions include a CAAT-motif in the *GRA1* gene (-76, -71) and 2 repeated sequences (A/TGAGACG) in all *GRA* promoters. Related sequence elements are also found in the upstream region of other *Toxoplasma* genes. Transfection of hybrid plasmid constructs, in which the 5'-untranslated regions of the *GRA1* and the *GRA6* genes were exchanged, showed that these regions play a major role in the level of expression.

INTRODUCTION

Toxoplasma gondii is an obligate intracellular protozoan parasite which can invade a wide range of host cells in any warm-blooded vertebrate. Generally benign for immunocompetent people, toxoplasmosis can be fatal in patients with immunodeficiency [28] and can also cause severe congenital disease that may lead to abortion [10].

The *Toxoplasma* parasite resides within a vacuole which is incapable of acidifying nor fusing with any membrane-bound organelle within the host-cell endocytic system [17-19, 42] and therefore, *T. gondii* is effectively hidden from the host defense. The parasitophorous vacuole space and membrane are extensively modified after *Toxoplasma* invasion. Parasite proteins associate with the parasitophorous vacuole membrane and with the tubulomembranous network within the vacuolar space [1, 9, 26, 39-40]. Most of these proteins are derived from the secretory dense granules. To date, 6 different dense granule proteins have been identified, named GRA1 to GRA6. Their genes have been cloned but the DNA sequences have not provided any clue for the function of the proteins and for their genetic regulation. Moreover, although there is an increasing number of genes from *T. gondii* that have been cloned and characterized, including house-keeping genes and genes encoding both surface or secretory antigens, detailed analysis of their promoter region is still lacking. The sequences of the 5'-flanking regions did not reveal any classical eukaryotic promoter sequence such as TATA-boxes or SPI motifs. A high G+C% (>55%) is the only noteworthy feature of the 5'-flanking regions of *Toxoplasma* genes (Lecordier et al., in preparation). Furthermore, so far, no transcription factor or RNA polymerase of the parasite has been characterized and no trans-splicing [2] has been reported yet.

We have cloned, sequenced and characterized four genes encoding *Toxoplasma* dense granules proteins, *GRA1* [7], *GRA2* [30], *GRA5* [25] and *GRA6* (Lecordier et al., in preparation). These molecules share a similar traffic within the parasite (storage in the dense granule organelles, secretion after invasion of the host-cell, targeting into the parasitophorous vacuole) [for review, 6, 8] and their secretion is regulated by a Ca²⁺-dependent pathway [37-38]. It is therefore tempting to speculate that expression of the different *GRA* genes may be coordinately regulated. We might expect that these genes contain common regulatory cis-acting elements in

their promoter regions. The goal of this study is therefore to define the cis-acting sequences responsible for transcription and defining the promoter regions of the *GRA* genes.

The recent development of a method that allows introduction of exogenous DNA into *Toxoplasma* cells combined with the use of the *cat* reporter gene led to the identification of a promoter region within 360 bp upstream from the translational start site of the *SAG1* gene [5]. A respectively eightfold and fourfold CAT activity was obtained when the \approx 1.35 kb and the \approx 3 kb 5'-region of the *ROPI* [34] and the *TUB1* [32] genes were cloned upstream from the *cat* reporter gene [43] but the promoter of these genes has not been mapped precisely yet.

We have used this novel transient DNA-transfection system to define the cis-acting elements responsible for transcription of 4 dense granule genes (*GRA1*, *GRA2*, *GRA5* and *GRA6*). Comparison of the promoter regions of the *GRA* genes revealed a set of common sequence elements, including 2 direct and/or inverted repeats. These repeats may constitute putative regulatory regions. A role of the 5'-untranslated regions for regulation of expression is also shown.

MATERIAL AND METHODS

GRA/CAT fusion constructs

The sequences of all the primers used in this study are given in Table I.

The sequences of the primers (sense and anti-sense) G1.1-G1.2, G2.1-G2.2, G5.1-G5.2 and G6.1-G6.2 used to construct the GRA1/CAT[-379], GRA2/CAT[-276], pGR5/CAT[-209] and GRA6/CAT[-265] respectively, are taken from the *GRA1*, *GRA2*, *GRA5* and *GRA6* sequences [7, 25, 30; Lecordier, Dubremetz et al., in preparation]. Additional bases were used in order to create a *NsiI* restriction site at the 5' end of the anti-sense primers and both a *XhoI* and a *HindIII* restriction sites at the 5' end of the sense primers. The conditions for Polymerase Chain Reaction (PCR) are those recommended by the manufacturer (Ampli-Taq DNA Polymerase, Perkin Elmer Cetus, Norwalk, CT, USA) in a final volume of 100 μ l. The samples covered with 100 μ l of mineral oil (Sigma, Saint-Quentin-Fallavier, France) were cycled 35 times using the following scheme: 94°C for 45 sec., 55°C for 1 min. and 72°C for 1min. on a Perkin Elmer Cetus Thermal Cycler. After removing the oil with one volume of chloroform, the amplified fragments were submitted to a proteinase K treatment (20 μ g.ml⁻¹) (Boehringer Mannheim, Germany) at 37°C for 30 min. and the cohesive ends *HindIII-NsiI* were generated by appropriated endonucleases digestion. The 5' flanking sequence of *SAG1* [5] contained in the SAG1/2-CAT vector [43] that was kindly provided by Drs D. Soldati and J.C. Boothroyd (Stanford, CA) was deleted, using the *HindIII* and *NsiI* restriction sites, in order to generate the SAG1.3'-CAT linearized vector. The 5' sequences of *GRA1*, *GRA2*, *GRA5* and *GRA6* previously amplified by PCR were cloned upstream the *cat* reporter gene of the SAG1.3'-CAT plasmid and then introduced into *Escherichia coli* JM109 (Stratagene, La Jolla, CA).

Deletion mutants were derived from the plasmids GRA1/CAT[-379], GRA2/CAT[-276], GRA5/CAT[-209] and GRA6/CAT[-265] by partial deletion of the 5' end of the *GRA* gene fragments. The deletions were carried out using the following restriction sites located in the 5' flanking sequences of the *GRA* genes: *BstEII*, *HindII* and *HinFI* for GRA1/CAT[-379] to generate GRA1/CAT[-264], GRA1/CAT[-156] and GRA1/CAT[-47] respectively; *RsaI* and *AvaI* for GRA2/CAT[-276] to generate GRA2/CAT[-175] and GRA2/CAT[-142]; *MluI* and

*Hind*II for GRA5/CAT[-205] to generate GRA5/CAT[-156] and GRA5/CAT[-30]; *Bcl*II and *Rsa*I for GRA6/CAT[-265] to generate GRA6/CAT[-146] and GRA6/CAT[-54]. The cohesive ends were blunted 30 min. at 37°C using the Kleenow fragment of *E. coli* DNA polymerase I (Boehringer) as described by Sambrook et al [35]. *Nsi*I cohesive ends were generated at the 3' ends by appropriated enzymatic digestion. The fragments were finally cloned into the blunted *Hind*III and cohesive *Nsi*I restriction sites of SAG1.3'-CAT.

The GRA1/CAT[-149], GRA1/CAT[-129], GRA1/CAT[-107], GRA2/CAT[-133], GRA2/CAT[-119], GRA2/CAT[-87] and GRA5/CAT[-113], GRA5/CAT[-92], GRA5/CAT[-65], GRA5/CAT[-51] constructs were generated by Exonuclease III. Briefly, the different GRA fragments amplified by PCR and then digested with *Xho*I (at the 5' end) and *Nsi*I (at the 3' end) were first cloned into the *Xho*I and *Nsi*I restriction sites of pGEM7Zf(+) (Promega, Madison, WI, USA). After digestion of the recombinant plasmids with *Kpn*I and *Sma*I (Boehringer), nested deletions were produced by the Exonuclease III/SI Nuclease technique with the Erase-a-Base Kit used as recommended by the supplier (Promega). Samples were taken at 30 sec. time intervals. A set of deletion clones was chosen, based on the size of their *Xho*I-*Nsi*I inserts on a 2.5% agarose gel in Tris-Acetate buffer stained with Ethidium Bromide. Single-stranded DNA was produced after coinfection of *E. coli* JM109 with the various pGEM7Zf(+)-GRA plasmids and the helper R408 (Promega). The exact extent of the deletions was determined by sequencing the single-stranded DNA of each clone using the "Multiwell Microtitre Plate DNA Sequencing System" (Amersham, Amersham, GB) and the M13-20 universal primer. The *Xho*I-*Nsi*I fragments of the selected mutants were cloned into the *Xho*I-*Nsi*I sites of SAG1.3'-CAT.

The primers G1.1-G1.3, G1.1-G1.4, G2.1-G2.3, G2.1-G2.4, G2.1-G2.5, G5.1-G5.3, G6.1-G6.4, G6.1-G6.5 (Table I) were used in PCR protocols described above in order to construct the GRA1/CAT[-80], GRA1/CAT[-70], GRA2/CAT[-73], GRA2/CAT[-65], GRA2/CAT [-37], GRA5/CAT[-13] and GRA6/CAT[-85], GRA6/CAT[-27] plasmid vectors.

GRA1.GRA6 and GRA6.GRA1/CAT hybrid constructs

The primer pairs G1.1-G1.5 and the G6.1-G6.6 (Table I) were used in PCR protocols as described above in order to amplify the 5'-untranslated regions of the *GRA1* and *GRA6* genes, respectively, and to introduce a *HindIII* restriction site at the cap site of each gene. The amplified products were cloned into the *HindIII* and *NsiI* restriction sites of SAG1.3'-CAT. The recombinant plasmids were introduced into *E. coli* JM109, purified and then, linearized by *XhoI* and *HindIII*. The amplified products generated by primers G1.2'-G1.6 and G6.2'-G6.7 (Table I) were digested by *XhoI* at their 5' end and by *HindIII* at their 3' end and cloned in *XhoI-HindIII*-digested G6.1-G6.6 and G1.1-G1.5 respectively, thereby generating the GRA1.GRA6/CAT and GRA6.GRA1/CAT plasmids.

Electroporation of tachyzoites cells

T. gondii tachyzoites (RH strain) were grown in Hep-2 cells until the infected cells lysed spontaneously. They were prepared for electroporation using a protocol adapted from that described by Soldati and Boothroyd [43]. Briefly, after harvesting and washing in cytomix buffer [44], 1.10^7 tachyzoites or 1.10^7 non infected Hep-2 cells were resuspended in 1 ml of cytomix buffer supplemented just before use with 2 mM Adenosine Triphosphate (pH7.6) and 5 mM Glutathione. Cells were then mixed with 10 μ g of plasmid DNA. All plasmids were prepared by ultracentrifugation on a Cesium Chloride-Ethidium Bromide gradient [35]. Before electroporation, they were microdialyzed for 1 hour against distilled water on a 0.22 μ m filter (Millipore, Molsheim, France). The mixture was then transferred to an electroporation cuvette (4-mm gap) (Biorad, Richmond, CA) and exposed to an electric pulse ('Gene Pulser' electroporator, Biorad) with a charging voltage of 2.25 kV, a resistance of 100 Ω , 25 μ F and a resulting pulse length of 0.6 to 0.7 msec. Electroporated cells were transferred into 10 ml of MEM medium containing 10% Fetal Calf Serum (Gibco, Paisley, Scotland) and 0.04% Gentamicin, incubated for 20 hours at 37°C and prepared for CAT assay.

Assay for CAT activity

Electroporated *Toxoplasma* cells were harvested and washed in 0.25 M Tris-HCl (pH7.8). After resuspension in 50 μ l of 0.25 M Tris-HCl (pH7.8), the cells were broken by three cycles of freezing and thawing. The lysate was cleared by centrifugation in a microfuge (10.000 g, 7 min.). CAT activity was assayed as previously described [13] in a 100 μ l (final volume) mixture of 0.25 M Tris-HCl (pH7.8), 560 μ g.ml⁻¹ AcetylcoA (Sigma), 0.075 μ Ci of [¹⁴C] Chloramphenicol (55 to 60 mCi/mmol, Amersham). The reaction mixture was incubated at 37°C for 3 hours with an additional dose of 560 μ g.ml⁻¹ AcetylcoA added after the first 1h30 of incubation. The acetylated forms of Chloramphenicol were extracted with 900 μ l of Ethyl Acetate (Merck, Darmstadt, Germany), dried, dissolved in 30 μ l of Ethyl Acetate and spotted onto a silica thin-layer chromatography plate (Merck). After chromatography for 2 hours in chloroform/methanol (95/5), the plate was dried and exposed to X-ray film (β -Max films, Amersham).

The *Toxoplasma* cellular extracts were prepared as described above for quantitative CAT assays. They were incubated in 100 μ l (final volume) of 0.25M Tris-HCl (pH7.8), 300 μ g.ml⁻¹ ButyrylcoA (Sigma), 0.075 μ Ci of [¹⁴C] Chloramphenicol (55 to 60 mCi/mmol, Amersham), following the protocol of Seed and Sheen [36]. The reaction mixture was incubated at 37°C for 3 hours with an additional dose of 300 μ g.ml⁻¹ of ButyrylcoA after 1h.30 of incubation. The acetylated forms of Chloramphenicol were extracted with 200 μ l of xylene (Merck). The resultant xylene phase was back-extracted with 100 μ l of distilled water. CAT activity was quantified by liquid scintillation counting in both acetylated and aqueous phases. A ratio was calculated between non-acetylated and acetylated forms and expressed in percent of acetylation. Each series of CAT assays was performed in triplicates and three independent sets of experiments at least were quantified.

RESULTS

5' regions of the *GRA* genes can drive transient cat gene expression in *T. gondii* tachyzoites

The SAG1/2-CAT plasmid containing the cat reporter gene flanked by the 5'- and 3'-untranslated regions of the gene encoding *SAG1* has been previously found to drive efficient CAT expression in *Toxoplasma* cells [43]. Digestion of this plasmid by *Hind*III and *Nsi*I resulted in SAG1.3'/CAT, a linearized plasmid which corresponds to the SAG1/2-CAT promoter-less vector.

The upstream region of each *GRA* open-reading-frame, including the 5'-flanking region and the 5'-untranslated region was amplified using primers that generate a *Nsi*I site at the 3' end and a *Hind*III site at the 5' end. The amplified products (607 bp for *GRA1*, 381 bp for *GRA2*, 315 bp for *GRA5* and 500 bp for *GRA6*) were cloned in frame with the ATG start codon of the cat reporter gene in the SAG1.3'/CAT expressing vector. The resulting constructs were respectively named GRA1/CAT[-379], GRA2/CAT[-276], GRA5/CAT[-209] and GRA6/CAT[-265] (figure 1), numbers in square brackets indicating the distances in base pairs to the cap site of the gene. Transfection of these constructs into tachyzoites led to marked CAT activities (figure 2), indicating that *GRA* promoters are localized within the regions that were amplified by PCR. Among the four *GRA* constructs tested in this study, the CAT activity detected for *GRA1* was the highest, fourfold higher than that of the *SAG1* construct used as control (81.5% of chloramphenicol conversion *versus* 21%, figure 2). *GRA2*, *GRA5* and *GRA6* gave CAT activities 2.4, 3 and 1.8 fold higher than *SAG1*, respectively, leading to 50.6%, 64.3% and 38.2% of chloramphenicol conversion (figure 2). For each *GRA* construct, negative controls consisted of tachyzoites mixed with plasmid DNA, without electroporation and of Hep2 cells electroporated with plasmid DNA, in the same conditions as for tachyzoites. In all cases, the percentage of chloramphenicol conversion did not exceed 10% (data not shown), confirming that the conditions of electroporation are adapted for *Toxoplasma* cells transfection and that plasmids are not passively delivered into tachyzoites. Another negative control consisted of tachyzoites electroporated without DNA, in order to verify the absence of bacterial contamination. All these

negative controls were performed for each transfection experiment reported in the following sections.

Analysis of the GRA promoter structures and identification of consensus repeated motifs involved in transcription

In order to define more precisely the localization of each *GRA* promoter, 5'-deletion mutants of the initial *GRA/CAT* constructs (figure 1) were performed using either restriction sites located in the 5'-flanking sequences or Exonuclease III deletion. Transfection of this first set of deletion mutants revealed that the DNA sequences essential for expression are comprized between -107 (maximal CAT activity) and -47 (extinction of *cat* expression) for *GRA1*, downstream from -87 for *GRA2*, between -51 (maximal CAT activity) and -30 (decrease of *cat* expression) for *GRA5* and between -146 (maximal CAT activity) and -54 (decrease of *cat* expression) for *GRA6* (data not shown). Comparison of nucleotide sequences revealed the presence of two repeated motifs in these essential regions and similar motifs were found in the upstream regions of the four *GRA* genes. Alignment between these motifs allowed to define the consensus *A/TGAGACG* (or its inverted form *CGTCTCT/A*) (figure 3 and Table II). In addition, a CAAT-box (-76, -71) was found in the *GRA1* 5' region.

To verify the role of these motifs on transcription of the *GRA* genes, another set of deletion mutants was constructed by cloning PCR fragments into *SAG1.3'/CAT*. Primers for PCR amplifications were chosen to precisely delete each of the identified motifs. The CAT activities of the resulting mutants, shown on figure 4A, indicate that maximal CAT activity was found until deletions [-107] for *GRA1*, [-73] for *GRA2*, [-51] for *GRA5* and [-85] for *GRA6* (figure 1). Total lack of CAT activity was obtained for deletions [-47] in *GRA1*, [-27] in *GRA6*, [-37] in *GRA2* and [-13] in *GRA5* (figure 1). Decreased, yet detectable CAT activity was obtained for deletions comprized between these extreme positions (deletion mutants [-80] and [-70] of *GRA1*, [-54] of *GRA6*, [-65] of *GRA2* and [-30] of *GRA5*, figure 1).

Therefore, the DNA sequences comprized between -107 and -47, -73 and -37, -51 and -13 and -85 and -27 were considered to define the promoter region of *GRA1*, *GRA2*, *GRA5* and *GRA6*, respectively (figure 3). Each of these four promoter regions comprizes also two consensus repeats, *GRA2*, *GRA5* and *GRA6* containing both the direct form and the inverted form

(A/GAGACG and CGTCTCT/A, respectively), *GRA1* containing two inverted forms (figure 3 and Table III). This last gene contains also a CAAT motif located between the two repeated motifs. Because *GRA1* seems also to present a repeats profile different from that of the other *GRA* genes, we choose *GRA1* and *GRA2* to evaluate by quantitative CAT assays, the importance of each repeated motif for expression of the *cat* reporter gene. Deletion of the motifs (1), (2), (3) and (4) of the *GRA1* gene (figure 3) did not affect expression of CAT activity (compare mutants [-129] and [-107], figure 4B). In contrast, deletion of the repeat (5) (figure 3) dramatically decreased the level of CAT activity (27% for mutant [-80] versus 79% for mutant [-107], figure 4B), indicating that the DNA sequence included between these two positions may be the major element promoting transcription of the *GRA1* gene. On the other hand, the "CAAT" motif comprized between mutants [-80] and [-70] (figure 3) seems to enhance moderately the level of transcription, since deletion of this sequence motif only reduced CAT activity from 27% to 21% (figure 4B). Quantitative CAT assays performed on the *GRA2* deletion mutants showed that deletion of the motif (1) (figure 3) does not affect the level of CAT activity (compare mutants [-276] and [-142], figure 4B). In contrast, sequences comprized between [-73] and [-65] appear to be critical for *cat* expression, since deletion of this region reduces CAT activity from 37% to 18.5% (figure 4B). Although this region appears to be the most important element involved in *cat* expression, we cannot exclude a role of the 5' upstream region and in particular, of the repeats (2) and (3) (figure 3) since the deletion between [-142] and [-87] decreased CAT activity from 46% to 38.5% (figure 4B).

Effect of the 5'-untranslated regions on the levels of CAT activity

Because the initial *GRA/CAT* constructs (figure 1) contained the 5'-untranslated regions of the corresponding *GRA* genes, we assessed the role of these sequences in the levels of CAT activity (figure 2). For this purpose, we have chosen the two *GRA* genes that drive either the highest (*GRA1*) or the weakest (*GRA6*) CAT activity.

PCR amplified fragments corresponding to the 379 bp 5'-flanking region of *GRA1* (including the cap site) fused to the 235 bp 5'-untranslated region of *GRA6* on one hand and to the 265 bp 5'-flanking region of *GRA6* (including the cap site) fused to the 228 bp 5'-untranslated region of *GRA1* on the other hand (figure 5A), were cloned upstream from the *cat* gene. The primers used

for these experiments allowed to generate an artificial *HindIII* site a few bases downstream from the cap sites and a *XhoI* site at the 5' end of the 5'-flanking sequences. The PCR fragments corresponding to the 5'-untranslated regions were bordered by a *NsiI* site at their 3' ends and a *HindIII* site at their 5' ends (figure 5A). The resulting hybrid constructs, termed GRA1.GRA6/CAT and GRA6.GRA1/CAT (figure 5A), were then tested in transfection experiments. The CAT activities detected for these constructs (figure 5B, lanes 2 and 3 respectively) appeared to be intermediate as compared with the high activity of the GRA1/CAT[-379] and the weak activity of the GRA6/CAT[-265] initial constructs (figure 5B, lanes 1 and 4 respectively). These results indicate that the 5'-untranslated regions of both the *GRA1* and *GRA6* genes modulate the level of *cat* expression, perhaps even more than their corresponding promoters. This was confirmed by quantitative CAT assays (figure 5C) showing that the *GRA1* 5'-untranslated region increased the level of CAT activity driven by the *GRA6* promoter about threefold (65% of chloramphenicol conversion for GRA6.GRA1/CAT versus 21% for GRA6/CAT[-265]), whereas the *GRA6* 5'-untranslated region led to a 1.5 fold decrease of CAT activity driven by the *GRA1* promoter (49% of chloramphenicol conversion for GRA1.GRA6/CAT versus 75.5% for GRA1/CAT[-379]).

DISCUSSION

T. gondii is an intracellular parasite that shares a number of biological features with *Plasmodium*, *Sarcocystis* and *Eimeria* which are important coccidian parasites of humans and animals. Recent development of molecular genetic systems for *Toxoplasma* cells [21, 41, 43] allows the exploration of mechanisms that drive gene expression in these organisms.

Whereas several genes of this protozoan have been cloned and sequenced in recent years, no transcription promoter has yet been characterized. Transient activity assays of the cat gene cloned downstream from truncated 5'-flanking regions of the *GRA* genes led to the identification of such promoter regions. Maximal CAT activities appeared to be dependent on the presence of DNA regions relatively proximal to the cap sites of each *GRA* gene, -107 to -47 for *GRA1*, -73 to -37 for *GRA2*, -54 to -13 for *GRA5* and -85 to -27 for *GRA6*. This observation is in agreement with the fact that in contrast to kinetoplastids [2], transcription in *Toxoplasma* and in coccidians in general appears to be monocitronic.

The DNA sequences defining the promoters of the 4 *GRA* genes do not appear to share significant homology with known promoters of higher eukaryotes. In particular, no canonical TATA box was found. Despite the relative richness of the *GRA* promoter regions in GC (Lecordier et al., in preparation), no classical SP1 consensus motif appears in these regions [12, 31]. Promoters that do not carry TATA elements nor SP1 binding sites have usually been found upstream of eukaryotic genes, whose expression is regulated during differentiation and development [29]. Therefore, it will be of interest to know whether the *GRA* promoters are inducible and whether transcription of the corresponding genes differ according to the stage of the parasite or according to the virulence of the strain. Dense granule proteins share similar trafficking within *Toxoplasma* cells [6, 8] and their secretion is regulated by Ca^{2+} [37-38], suggesting that expression of *GRA* genes may be regulated by similar processes. In that case, one would expect these genes to contain common or related regulatory cis-acting elements in their promoter regions. Sequence comparison of the *GRA* genes upstream regions pointed out the presence of numerous repeated motifs. These motifs are present on both orientations : A/TGAGACG or its inverted form CGTCTCT/A. Deletion experiments showed that only two

motifs, the most proximal to the cap site, are essential to promote maximal CAT activity in each of the *GRA* promoter regions (figure 3 and TableII). It is highly improbable that this purine-rich motif should occur only by chance in comparable locations in all four sequenced *GRA* genes. Furthermore, considering that the fifth A/TGAGACG motif of the *GRA2* upstream region (figure 3) is comprized between two deletion mutants distant by only 12 bp and that deletion of these 12 bp has a dramatic effect on *cat* expression (37% to 18.5%), we consider this sequence element functionally important. Two independent observations suggest the implication of these repeats in the expression. First, a related polypurine motif is also found in the putative promoter region of other *Toxoplasma* genes. This motif occurs 4 times within the *SAG1* 5'-flanking region [5] involved in *SAG1* expression and one copy is found in the 5'-environment of *TUB1* [32]. As compared with the *GRA* promoters, the proximity of one of these motifs to the cap site of the *TUB1* gene (-30, -24) or of the *SAG1* gene (-85, -79) is in agreement with a functional role of this consensus. Five similar motifs are also present in the 300 bp upstream region of the 5S gene [14] at positions -298 to -292, -264 to -258, -210 to -204, -125 to -119 and -57 to -51. Second, despite a lack of sequence homology with the canonical SP1 consensus element [20], some similarities in their genomic organization suggest that the A/TGAGACG consensus motif defined for the *GRA* genes may act as a SP1-like element. Similarly to the GC-rich motif recognized by the SP1 transcriptional factor, the purine-rich sequence elements of *T. gondii* are present in tandem arrays in the case of the *SAG1* gene and in both orientations upstream of the cap sites of the *GRA* genes. Like promoters that are SP1-responsive, the *GRA* upstream regions contain multiple consensus elements, the most important of which for transcription being located closest to the transcriptional start site, *i.e.* approximately 40-70 nucleotides upstream from the RNA start site [20]. Obviously, work are in progress to identify *Toxoplasma* nuclear factors binding the consensus element.

Related polypurine motifs have already been reported in promoter regions of other protozoan parasites but in all cases, the functional role of these motifs has not yet been explored. For example, Barahona et al. [3] drew the attention to the presence of a A/TGAGAG motif in the promoter region of the tubulin genes of the ciliate protozoan *Tetrahymena pyriformis*. The same motif was found in the upstream region of other ciliate genes, including histone genes of *Tetrahymena* [4, 33, 45]. Moreover, a repeated motif that resembles those found in both the

Toxoplasma and ciliate promoters (T/AGTGTAC) was reported in the promoter region of the *Plasmodium* GBP130 and KAHRP genes [22-24].

Differences in the CAT activity levels were observed depending on the *GRA* upstream regions used to drive expression of the *CAT* gene. A canonical CAAT-box is found at positions (-76, -71) upstream from the *GRA1* cap site. Although it is an expected position for a functional CAAT-box relative to the transcription start site, deletion of this putative CAAT-box did not dramatically reduce the CAT activity (27% to 21% of chloramphenicol conversion). This suggests that its involvement is moderate in comparison to that of the repeats (5) and (6) of *GRA1* (figure 3). Furthermore, transfection of hybrid constructs has shown that *cat* expression under the control of the GRA6 promoter is enhanced three-fold by the 5'-untranslated region of *GRA1*. Although we cannot exclude the presence of a strong enhancer element in this particular region, these observations suggest that the 5'-untranslated regions of the *GRA* genes may play an important role to control the production of the corresponding proteins, at the post-transcriptional level.

Because short leader sequences may be optimal for efficient translation, the presence of rather long 5'-untranslated regions in *Toxoplasma* transcripts, like in other coccidian parasites [27], suggests that they are retained for some biological purpose, perhaps interaction with the ribosome or with regulatory proteins.

To our knowledge, this work constitutes the first characterization of the minimal sequence elements necessary for initiation of transcription in *Toxoplasma* genes. Further experiments are in progress to assess the role of the repeated consensus motif in the regulation of the *GRA* genes and to explore the role of the 3'-untranslated region for the stability of the corresponding messengers [11, 15-16].

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Drs. D. Soldati and J.C. Boothroyd for providing SAG1/2-CAT. We are grateful to Drs C. Locht, E. Pays and C. Verwaerde for critically reading the manuscript, to Drs. P. Bertin and C. Lemaire for helpful discussions. We thank Dr. J.P. Kusnierz for oligonucleotides synthesis, H. Caron for parasite production and C. Drolez for iconography.

This work was supported by INSERM, CNRS and Institut Pasteur de LILLE. C. M. was supported by a doctoral grant of the french Ministry for Research and Technology.

REFERENCES

1. Achbarou, A., O. Mercereau-Puijalon, A. Sadak, B. Fortier, M.A. Leriche, D. Camus, and J.F. Dubremetz. 1991. Differential targeting of dense granule proteins in the parasitophorous vacuole of *Toxoplasma gondii*. *Parasitol.* **103**: 321-329.
2. Agabian, N. 1990. Trans-splicing of nuclear pre-mRNAs. *Cell.* **61**: 1157-1160.
3. Barahona, I., H. Soares, L. Cyrne, D. Penque, P. Denoulet, and C. Rodrigues-Pousada. 1988. Sequence of one α - and two β - tubulin genes of *Tetrahymena pyriformis*. *J. Mol. Biol.* **202**: 365-382.
4. Brunk, C.F., and L.A. Sadler. 1990. Characterization of the promoter region of *Tetrahymena* genes. *Nucl. Acids Res.* **18**: 323-329.
5. Burg, J. L., D. Perelman, L.H. Kasper, P.L. Ware, and J.C. Boothroyd. 1988. Molecular analysis of the gene encoding the major surface antigen of *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* **141**: 3584-3591.
6. Cesbron-Delauw, M. F. Submitted for publication.
7. Cesbron-Delauw, M. F., B. Guy, G. Torpier, R.J. Pierce, G. Lenzen, J.Y. Cesbron, H. Charif, P. Lepage, F. Darcy, J.P. Lecocq, and A. Capron. 1989. Molecular characterization of a 23-kilodalton major antigen secreted by *Toxoplasma gondii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **86**: 7537-7541.
8. Cesbron-Delauw, M. F., C. Mercier, L. Lecordier, F. Darcy and, A. Capron. 1993. Dense granule antigens from *Toxoplasma gondii*. p. 33-41. *In Toxoplasmosis* J.E. Smith (ed.), NATO ASI Series. vol. H78, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
9. Charif, H., F. Darcy, G. Torpier, M.F. Cesbron-Delauw and, A. Capron. 1990. *Toxoplasma gondii*: characterization and localization of antigens secreted from tachyzoites. *Exp. Parasitol.* **71**: 114-124.
10. Desmots, G. and, J. Couvreur. 1974. Toxoplasmosis in pregnancy and its transmission to the fetus. *Bull. N.Y. Acad. Med.* **50**: 146-159.

11. **Duret, L., F. Dorkeld and, C. Gautier.** 1993. Strong conservation of non-coding sequences during vertebrates evolution: potential involvement in post-transcriptional regulation of gene expression. *Nucl. Acids Res.* **21**: 2315-2322.
12. **Dynan, W.S. and, R. Tjian.** 1985. Control of eukaryotic RNA synthesis by sequence-specific DNA binding proteins. *Nature* **316**: 774-778.
13. **Gorman, C. M., L. F. Moffat and, B.H. Howard.** 1982. Recombinant genomes which express chloramphenicol acetyltransferase in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* **2**: 1044-1051.
14. **Guay, J. M., A. Huot, S. Gagnon, A. Tremblay and, R.C. Levesque.** 1992. Physical and genetic mapping of cloned ribosomal DNA from *Toxoplasma gondii*: primary and secondary structure of the 5S gene. *Gene* **114**: 165-171.
15. **Hug, M., V.B. Carruthers, C. Hartmann, D.S. Sherman, G.A.M. Cross and, C. Clayton.** 1993. A possible role for the 3'untranslated region in developmental regulation in *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **61**: 87-96.
16. **Jefferies, D., P. Tebabi and, E. Pays.** 1991. Transient activity assays of the *Trypanosoma brucei* Variant Surface Glycoprotein Gene promoter: control of gene expression at the posttranscriptional level. *Mol. Cell. Biol.* **11**: 338-343.
17. **Joiner K.A., S.A. Fuhrman, H.M. Miettinen, L.H. Kasper and, I. Mellman.** 1990. *Toxoplasma gondii*: fusion competence of parasitophorous vacuoles in Fc receptor-transfected fibroblasts. *Science* **249**: 641-646.
18. **Jones, T.C., S. Yeh and, J.G. Hirsch.** 1972. The interaction between *Toxoplasma gondii* and mammalian cells.I. Mechanism of entry and intracellular fate of the parasite. *J. Exp. Med.* **136**: 1157-72.
19. **Jones, T.C. and, J.G. Hirsch.** 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.
20. **Kadonaga, J.T., K.A. Jones and, R. Tjian.** 1986. Promoter-specific activation of RNA polymerase II transcription by Sp1. *TIBS.* **11**: 20-23.
21. **Kim, K., D. Soldati and J.C. Boothroyd.** 1993. Gene replacement in *Toxoplasma gondii* with Chloramphenicol Acetyltransferase as selectable marker. *Science* **262**: 911-914.

22. **Lanzer, M., D. de Bruin and, J.V. Ravetch.** 1992. A sequence element associated with the *Plasmodium falciparum* KAHRP gene is the site of developmentally regulated protein-DNA interactions. *Nucl. Acids Res.* **20**: 3051-3056.
23. **Lanzer, M., D. de Bruin and, J. V. Ravetch.** 1992. Transcription mapping of a 100 Kb locus of *Plasmodium falciparum* identifies an intergenic region in which transcription terminantes and reinitiates. *EMBO J.* **11**: 1949-1955.
24. **Lanzer, M., S.P. Wertheimer, D. de Bruin, D. and, J. V. Ravetch.** 1993. *Plasmodium*: control of gene expression in malaria parasites. *Exp. Parasitol.* **77**: 121-128.
25. **Lecordier, L., C. Mercier, G. Torpier, B. Tourvieille, F. Darcy, J. Liu, P. Maes; A. Tartar, A. Capron and, M.F. Cesbron-Delauw.** 1993. Molecular structure of a *Toxoplasma gondii* dense granule antigen (GRA5) associated with the parasitophorous vacuole membrane. *Mol. Biochem. Parasitol.* **59**: 143-154.
26. **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.
27. **Levitt, A.** 1993. RNA processing in malaria parasites. *Parasitol. Today* **9**: 465-468.
28. **Luft, B.J. and, J.S. Remington.** 1992. Toxoplasmic encephalitis in AIDS. *Clin. Infect. Dis.* **15** : 211-222.
29. **Maniatis, T., S. Goodbourn and, J.A. Fischer.** 1987. Regulation of inducible and tissue-specific gene expression. *Science* **236**: 1237-1245.
30. **Mercier, C., L. Lecordier, F. Darcy, D. Deslée, A. Murray, B. Tourvieille, P. Maes, A. Capron and, M.F. Cesbron-Delauw.** 1993. Molecular characterization of a dense granule antigen (GRA2) associated with the network of the parasitophorous vacuole in *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **58**: 71-82.
31. **Mitchell, P.J. and, R. Tjian.** 1989. Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins. *Science* **245**: 371-378.
32. **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.

33. **Nomoto, M., N. Imai, H. Saiga, T. Matsui T. and, T. Mita.** 1987. Characterization of two types of histone H2B genes from macronuclei of *Tetrahymena thermophila*. Nucl. Acids Res. **15**: 5681-5697.
34. **Ossorio, P. N., J. D. Schwartzman and, J.C. Boothroyd.** 1992. A *Toxoplasma gondii* rhoptry protein associated with host-cell penetration has unusual charge asymetry. Mol. Biochem. Parasitol. **50**: 1-16.
35. **Sambrook, J., E.F.T. Fritsch and, T. Maniatis.** 1989. Molecular cloning. A laboratory Manual. 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
36. **Seed, B. and, J.-Y. Sheen.** 1988. A simple phase-extraction assay for chloramphenicol acyltransferase activity. Gene **67**: 271-277.
37. **Sibley, L. D.** 1993. Interactions between *Toxoplasma gondii* and its mammalian host cells. Semin. Cell Biol. **4**: 335-344.
38. **Sibley, L. D. and, J. C. Boothroyd.** 1992. Calcium-regulated secretion and modification of host cell endocytic compartments by *Toxoplasma*. 16A, p. 163. Abstr. Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology. J. Cell. Biochem. 1992.
39. **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.
40. **Sibley, L.D., J.L. Krahenbuhl, G.M. Adams, and, E. Weidner.** 1986. *Toxoplasma* modifies macrophage phagosomes by secretion of a vesicular network rich in surface proteins. J. Cell Biol. **103**: 867-874.
41. **Sibley, L. D., E. R. Pfefferkorn and, J.C. Boothroyd.** 1993. Parasite genomes - Development of genetic systems for *Toxoplasma gondii*. Parasitol. Today **9**: 392-395.
42. **Sibley, L.D., E. Weidner and, J.L. Krahenbuhl.** 1985. Phagosome acidification blocked by intracellular *Toxoplasma gondii*. Nature **315**: 416-419.
43. **Soldati, D. and, J. C. Boothroyd.** 1993. Transient transfection and expression in the obligate intracellular parasite *Toxoplasma gondii*. Science **260**: 349-352.
44. **van den Hoff, M. J. B., A. F. M. Moorman and, W.H. Lamers.** 1992. Electroporation in "intracellular" buffer increases cell survival. Nucl. Acids Res. **20**: 2902.

45. Wu, M., D.D. Allis, R. Richman, R.G. Cook and, M.A. Gorovski. 1986. An intervening sequence in an unusual histone H1 gene of *Tetrahymena thermophila*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **83**: 8674-8678.

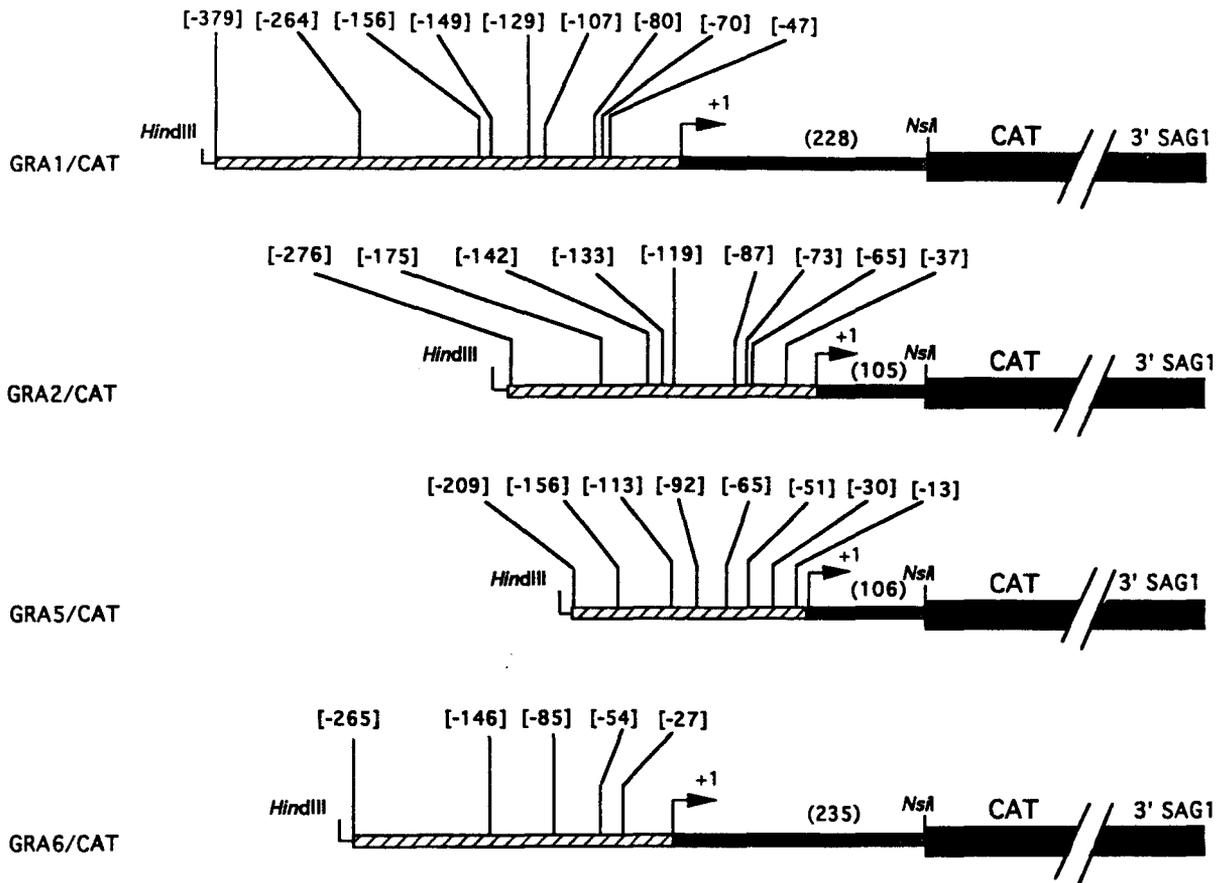


Figure 1: Schematic representation of the reporter GRA/CAT constructs

Black boxes indicate the CAT coding sequence followed by the 3'-untranslated sequence of *SAG1*. The transcriptional start site of each *GRA* gene is indicated by the bent arrows (+1). Stippled boxes indicate the 5'-untranslated regions of each *GRA* gene; the length in base pairs of these regions is indicated in brackets. Hatched boxes represent the 5'-flanking regions. The deletion mutants are indicated by numbers in square brackets. These numbers refer to the distance in base pairs between the 5'-upstream region and the cap site.

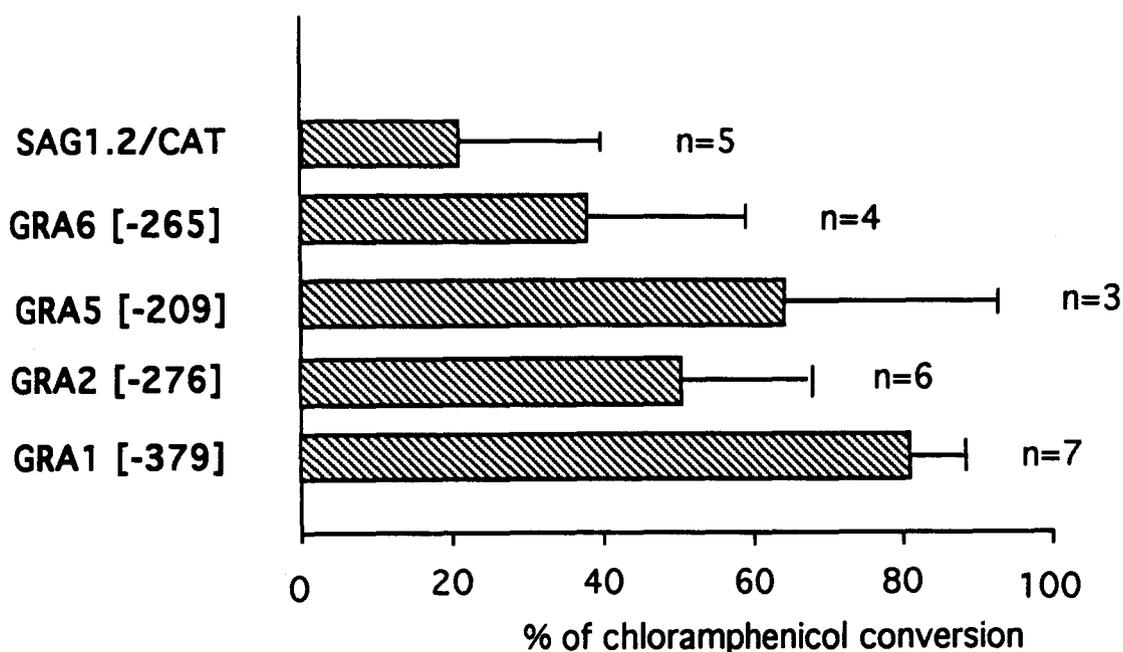


Figure 2: *CAT* expression using the *GRA1*, *GRA2*, *GRA5* and *GRA6* promoter regions in comparison to the *SAG1* promoter region.

The 5' regions of the *GRA1*, *GRA2*, *GRA5* or *GRA6* genes were cloned upstream of the *CAT* gene in the SAG1.3'/*CAT* promoter-less vector and transfected by electroporation into tachyzoites of the *T. gondii* RH strain. The *SAG1* promoter was used as a positive control (SAG1.2/*CAT*). *CAT* activities are expressed as an average value of absolute % of chloramphenicol acetylation derived from 3 to 7 (n) transfection experiments. Numbers in square brackets refer to the 5'-deletion mutants mapped on **figure 1**.

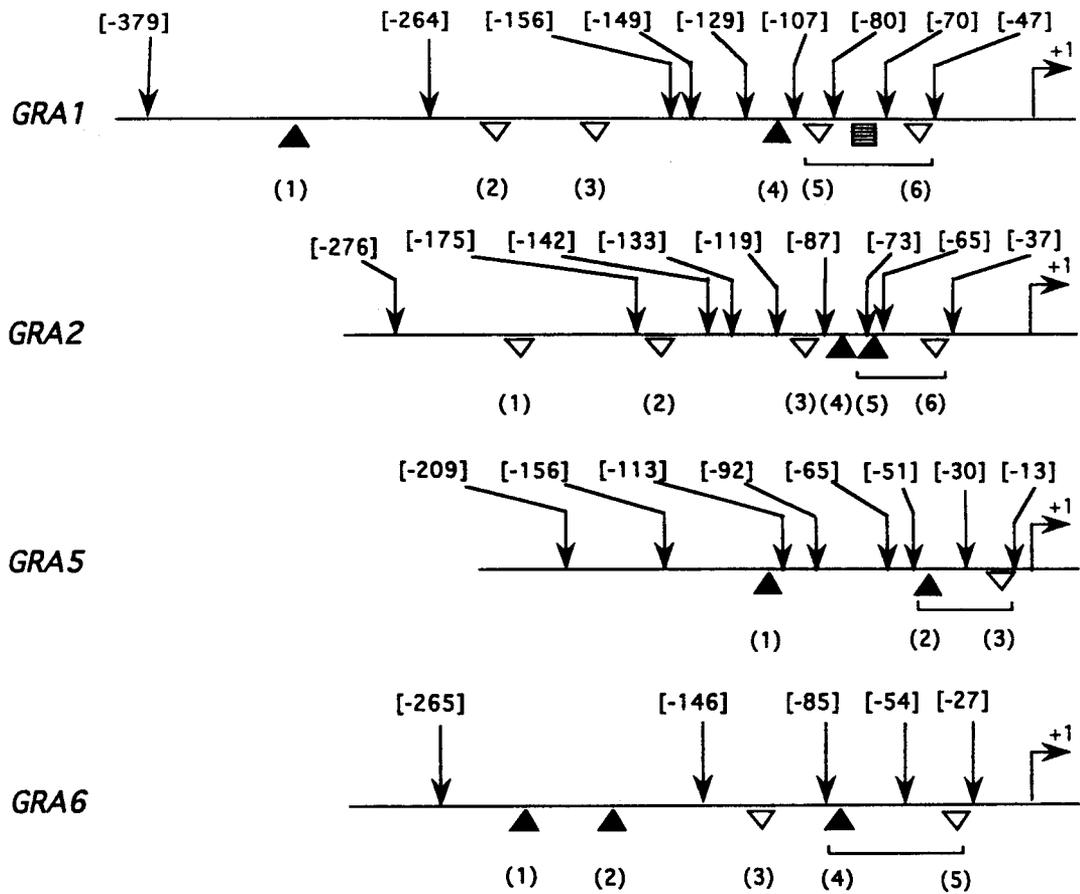


Figure 3: Structural analysis of the upstream regions of the *GRA* genes.

Numbers in square brackets refer to the 5' deletion mutants mapped on **figure 1** and indicate the distances in base pairs to the RNA initiation site indicated by the bent arrows (+1), CAAT motif. Open triangles represent the inverted repeats; black triangles, the direct repeats. These repeats are also numbered (numbers in brackets). Repeats found to be essential for expression are underlined.

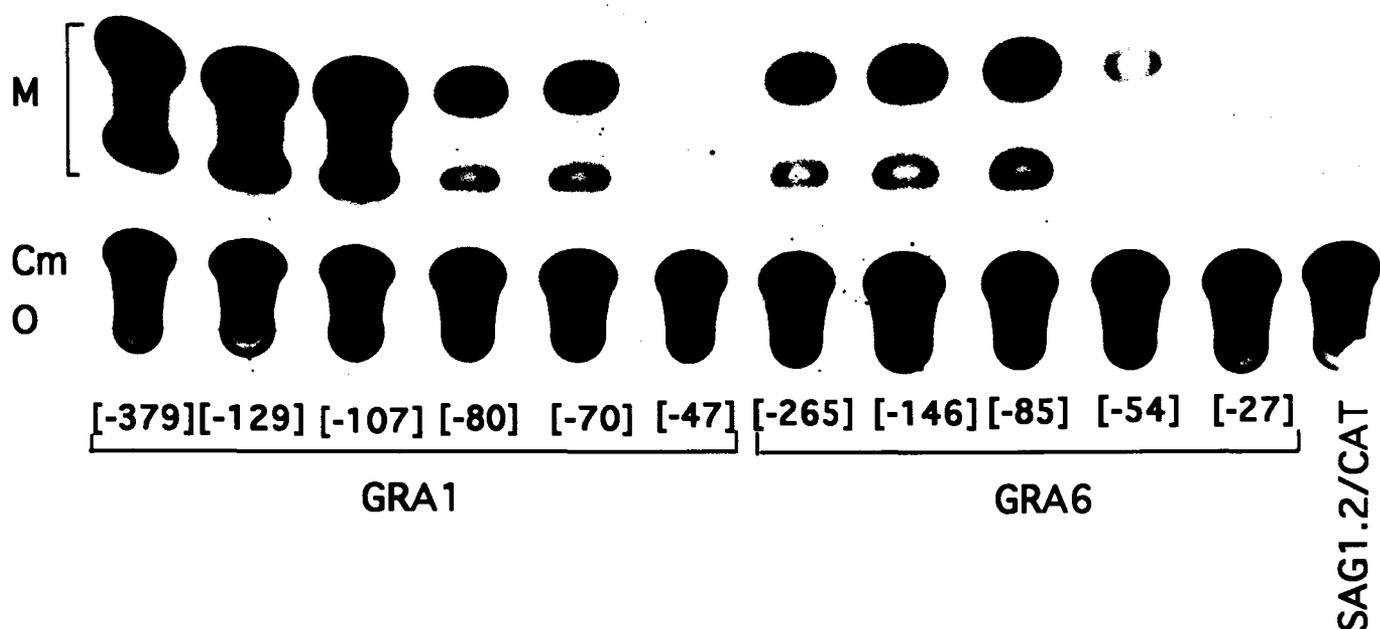


Figure 4A: *CAT* expression under the control of sub-fragments of the *GRA1*, *GRA2*, *GRA5* and *GRA6* promoter regions.

CAT activities of lysates of parasites transfected with the *GRA1/CAT* (**GRA1**), *GRA2/CAT* (**GRA2**), *GRA5/CAT* (**GRA5**) and *GRA6/CAT* (**GRA6**) deletion mutants were analyzed by thin layer chromatography. The *SAG1/2-CAT* construct was used as a positive control of transfection and *CAT* assay. **Cm**: unacetylated chloramphenicol, **M**: the two monoacetylated forms, **D**: diacetylated form, **O**: origin. Numbers in square brackets refer to the 5' deletion mutants mapped on **figure 1**.

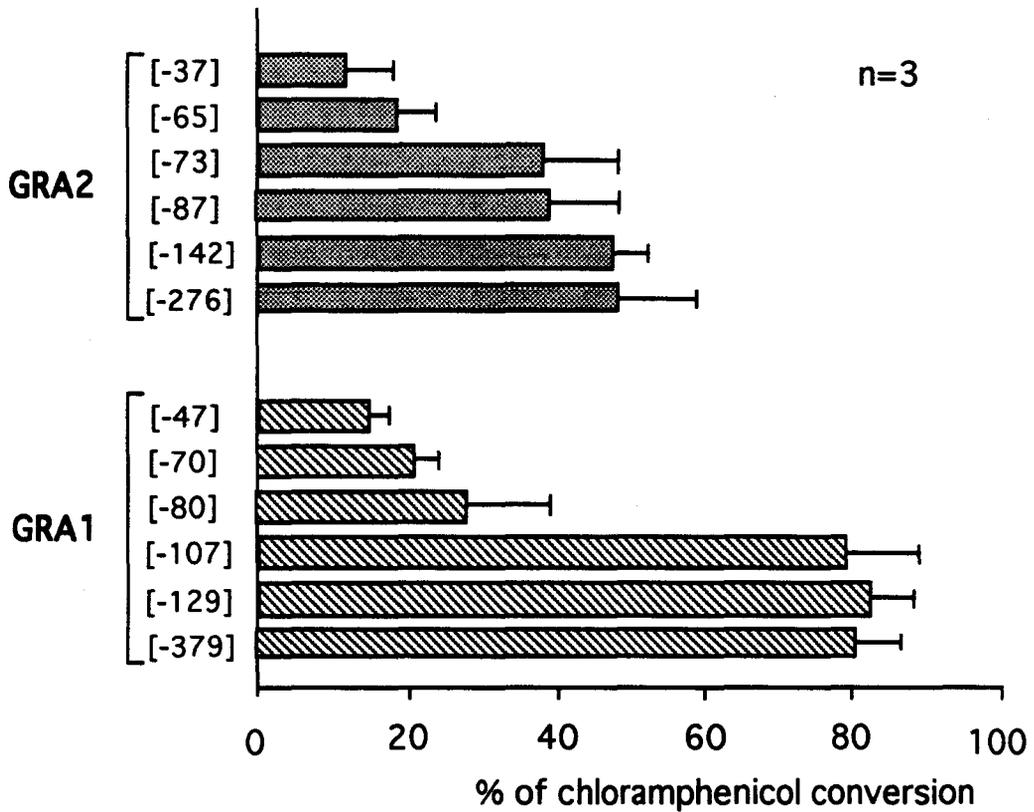


Figure 4B: *CAT* expression under the control of sub-fragments of the *GRA1* and *GRA2* promoter regions.

CAT activities are expressed as an average value of absolute % of chloramphenicol acetylation derived from 3 independent transfection experiments. Numbers in square brackets refer to the 5' deletion mutants mapped on **figure 1**.

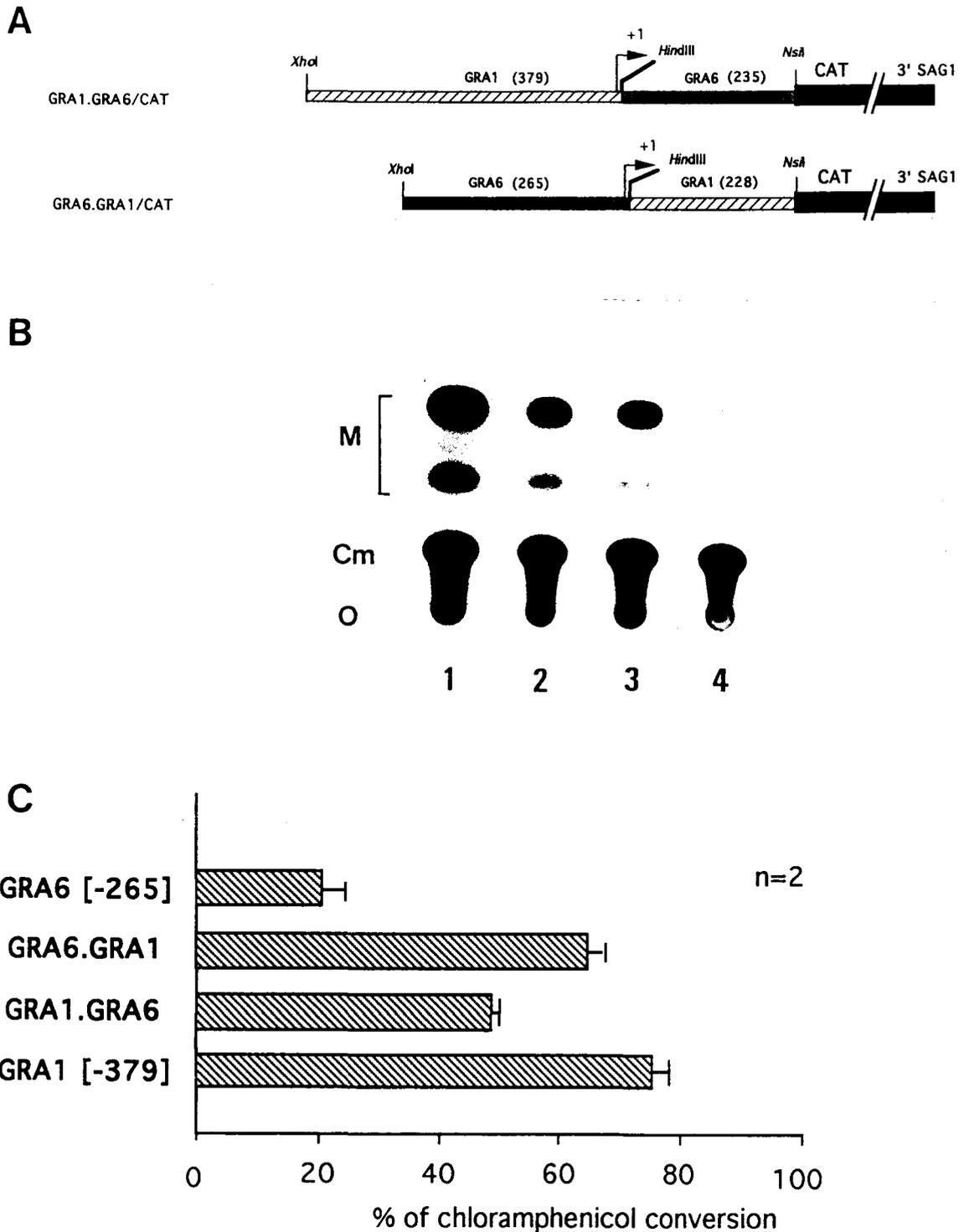


Figure 5: Role of the 5' untranslated regions in *GRA* gene expression.

(A) Schematic representation of the *GRA1.GRA6/CAT* and *GRA6.GRA1/CAT* hybrid constructs. Hatched boxes indicate DNA segments from the *GRA1* gene. Stippled boxes represent DNA fragments derived from the *GRA6* gene. A *HindIII* site was artificially introduced by PCR a few bases downstream of the cap sites. Black boxes correspond to the coding region of the *CAT* reporter gene followed by the 3' untranslated region of *SAG1*.

(B) *CAT* activities of lysates of parasites transfected with the *GRA1.GRA6/CAT* (2) and the *GRA6.GRA1/CAT* (3) hybrid constructs were analyzed by thin layer chromatography in comparison to the *GRA1/CAT* [-379] (1) and *GRA6/CAT* [-265] (4) initial constructs. Migration of unacetylated chloramphenicol (Cm) and the 2 monoacetylated forms (M) relative to the origin (O) are indicated.

(C) *CAT* activities induced by the *GRA1.GRA6/CAT* and *GRA6.GRA1/CAT* plasmid constructs in comparison with the *GRA1/CAT* [-379] and *GRA6/CAT* [-265] initial constructs. *CAT* activities are expressed as an average value of absolute % of chloramphenicol acetylation derived from 2 independent transfection experiments.

OLIGONUCLEOTIDES DEDUCED FROM THE *GRA1* SEQUENCE

- G1.1: 5' GGATCGATGCATCTTGCTTGATTTCTTCAAAGAAC 3' (35 b, S)
 G1.2: 5' CTAGCACTCGAGA**AAGCTT**CGAAGGCTGCTAGTACTGGTGATC 3' (42 b, AS)
 G1.2': 5' CGCTTCTCGAGTCGAAGGCTGCTAGTACTGGTGAT 3' (35 b, S)
 G1.3: 5' CTAGCACTCGAGA**AAGCTT**CCCGGTCCACCGCTGCG 3' (35 b, S)
 G1.4: 5' CTAGCACTCGAGA**AAGCTT**CGGACCAATTCCCGGTCCAC 3' (38b, S)
 G1.5: 5' CGATGCA**AAGCTT**TGCAATTTTATCGGTTG 3' (29 b, S)
 G1.6: 5' CAGCATGA**AAGCTT**AATGTTGTGGCTTTAC 3' (29 b, AS)
-

OLIGONUCLEOTIDES DEDUCED FROM THE *GRA2* SEQUENCE

- G2.1: 5' ACGGATCGATGCATTGTGAGGCGATATGTGGAG.3' (33 b, S)
 G2.2: 5': CACGACTCGAGA**AAGCTT**ACGCGTATCACGTCAGTCCTTAC 3' (40 b, AS)
 G2.3: 5' CTAGCACTCGAGA**AAGCTT**CGCCAGAGACGCAAAATG 3' (36 b, S)
 G2.4: 5' CTAGCACTCGAGA**AAGCTT**CAAAATGAACAGCGGAAG 3' (36 b, S)
 G2.5: 5' CTAGCACTCGAGA**AAGCTT**GTCTGTCCTGCGAACTGATC 3' (38 b, S)
-

OLIGONUCLEOTIDES DEDUCED FROM THE *GRA5* SEQUENCE

- G5.1: 5' GGATCGATGCATTTTGTACTTACGAAAATCGC 3' (34 b, AS)
 G5.2: 5' CATGCACTCGAGA**AAGCTT**CGCATGACTCCCTCAG 3' (34 b, S)
 G5.3: 5' CTAGCACTCGAGA**AAGCTT**CGATCCTACCGTCAGTC 3' (35 b, S)
-

OLIGONUCLEOTIDES DEDUCED FROM THE *GRA6* SEQUENCE

- G6.1: 5' ACGGATCGATGCATTTTCGCCGACACTCCCAAG 3' (32 b, AS)
 G6.2: 5' CATGCACTCGAGA**AAGCTT**CCGTCACCACAACCTAGCAAC 3' (39 b, S)
 G6.2': 5' CATGCACTCGAGCGTCACCACAACCTAGC 3' (29 b, S)
 G6.4: 5' CTAGCACTCGAGA**AAGCTT**CTGCGACGCGGAGCAGGAAC 3' (38 b, S)
 G6.5: 5' CTAGCACTCGAGA**AAGCTT**GCAAATGCCCACTGGCTGAC 3' (38 b, S)
 G6.6: 5' CGTAGCTA**AAGCTT**TGCGTCGTCGAATGC 3' (28 b, S)
 G6.7: 5' GAGCATGA**AAGCTT**ATTCTACTAATGGGGAAG 3' (31 b, AS)
-

Table I : Name, sequence and length (in bases) of each primer used for PCR amplifications. **S**: Sense primer; **AS**: Anti-sense primer. The additional bases used to create restriction sites are indicated in bold (*Nsi*I), italics (*Xho*I) or are underlined (*Hind*III).

GRA genes ¹			
GRA1	GRA2	GRA5	GRA6
(1) CGACACG (-349, -343) D	(1) TGCGACG (-208, -202) I		(1) AGACACG (-245, -239) D
(2) TGAGACG (-251, -245) I	(2) AGAGACG (-172, -166) I		(2) TGCGACG (-158, -152) D
(3) CGTGACG (-210, -204) I	(3) AGAGATG (-95, -88) I	(1) AGACACG (-123, -117) D	(3) AGCGACG (-121, -115) I
(4) TGAGACG (-125, -119) D	(4) AGAGACG (-84, -78) D	(2) AGAGACG (-47, -41) D	(4) TGCGACG (-85, -79) D
(5) TGAGACG (-90, -84) I	(5) AGAGACG (-72, -66) D	(3) AGTGCCG (-20, -14) I	(5) TGAGACG (-35, -29) I
(6) CGAGACG (-56, -50) I	(6) AGCGACG (-44, -38) I		
Other <i>Toxoplasma</i> genes ²			
TUBI		SAG1	
GGAGATG	(-30, -24) D	TGAGACG	(-193, -187) D
		TGACACG	(-166, -160) D
		TGAGACG	(-139, -133) D
		TGAGACG	(-112, -106) D
		TGAGACG	(-85, -79) D
CONSENSUS REPEATED MOTIF ³			
T A G A G A C G			
(85)(100)(73) (85)(96) (92) (100)			

Table II : Sequence of repeated motifs in the upstream region of the *Toxoplasma* genes

The repeats appear on a direct form **A/TGAGACG (D)** or on the inverted form **CGTCTCT/A (I)** in the upstream region of the *GRA* genes (1) and other *Toxoplasma* genes (2). Numbers in brackets on the left refer to locations of the repeats on **figure 3**. Numbers in brackets on the right indicate the distance in base pairs of the first and the last base of the repeat to the cap site of the gene. The consensus sequence is deduced in (3). Numbers in brackets are the percentages of conservation for each base. Bold letters indicate the bases identical with the deduced consensus motif.

3ÈME PARTIE**CONCLUSION**

Toxoplasma gondii est un parasite intracellulaire strict, capable d'envahir de nombreux types cellulaires. A ce jour, seuls les protoplastes de plantes et les hématies sont restés insensibles à cette infection parasitaire (Werk and Fischer, 1982; Werk, 1985). De même, ce protozoaire est retrouvé dans toutes les populations animales sauvages et domestiques de par le monde. Pendant l'infection aiguë, les formes infestantes du parasite (tachyzoïtes) envahissent activement les cellules de l'organisme infecté en formant une vacuole parasitophore. La dissémination de la population parasitaire est cependant rapidement contrôlée par la mise en place d'une réponse immunitaire à médiation cellulaire et humorale (Krahenbuhl and Remington, 1982). La pathogénèse est de ce fait très fortement limitée. L'infection progresse alors vers un stade chronique sans complication, caractérisé par la persistance de formes kystiques dans les tissus de l'hôte. L'immunité qui persiste toute la vie, protège l'individu contre toute réinfection ou réactivation.

Il existe cependant deux exceptions à ce processus naturel. L'infection *in utero* du fœtus peut conduire à un avortement spontané ou à des malformations congénitales très sévères (Desmonts and Couvreur, 1974). De même, en cas de déficit immunitaire, la réactivation des parasites enkystés (bradyzoïtes) se traduit généralement par une encéphalite toxoplasmique le plus souvent fatale. Depuis l'expansion des infections toxoplasmiques liées au virus du SIDA, les recherches se sont intensifiées dans le domaine de la compréhension des mécanismes mis en oeuvre par le parasite pour survivre et se multiplier dans la cellule-hôte. Ce "succès parasitaire" est lié, lors de la pénétration dans cette cellule, à la formation d'une vacuole qui dérive de la membrane de la cellule-hôte et est appelée "vacuole parasitophore". La membrane de cette vacuole perd rapidement les marqueurs de la cellule-hôte et sa composition est très rapidement modifiée par les produits de sécrétion du Toxoplasme. L'espace intravacuolaire s'organise alors en réseau de tubules membranaires qui assurent la connexion entre le parasite et la cellule-hôte (Sibley, Krahenbuhl et al., 1986). La vacuole est alors capable de résister à la fusion avec les lysosomes (Jones and Hirsch, 1972; Jones, Yeh et al., 1972) et les compartiments endocytiques de la cellule-hôte (Joiner, Fuhrman et al., 1990), ce qui lui permet de garder un pH neutre (Sibley, Weidner et al., 1985).

Alors que le rôle sécrétoire des rhoptries dans le processus d'invasion et d'installation du parasite dans la cellule-hôte est maintenant clairement établi (Nichols, Chiappino et al., 1983; Werk, 1985), le rôle des granules denses dans ces processus a longtemps été ignoré. Il a cependant été récemment démontré qu'ils constituaient une source importante de molécules sécrétées lors ou juste après l'invasion et responsables de la modification de la vacuole parasitophore (Cesbron-Delauw, Guy et al., 1989; Charif, Darcy et al., 1990; Achbarou, Mercereau-Puijalon et al., 1991b; Dubremetz, Achbarou et al., 1993).

La plupart des molécules sécrétées à partir des granules denses sont retrouvées dans une préparation antigénique appelée AES (Antigènes d'Excrétion-Sécrétion) (Darcy, Deslée et al., 1988; Cesbron-Delauw and Capron, 1993). La production d'hybridomes contre certains de ces AES (Charif, Darcy et al., 1990) ou contre les fractions sub-cellulaires du tachyzoïte ainsi qu'un lysat entier de parasites (Leriche and Dubremetz, 1991; Mévelec, Chardès et al., 1992) a permis d'obtenir des anticorps monoclonaux spécifiques des certains des composants des granules denses. Ces molécules ont par la suite été dénommées molécules GRA (Sibley, Pfefferkorn et al., 1991).

Le clonage du gène codant pour l'antigène GRA2 s'est inscrit dans l'étude menée dans notre laboratoire visant à caractériser les antigènes de granules denses, ceci afin d'obtenir les outils moléculaires nécessaires à l'exploration des fonctions des molécules GRA dans la relation hôte-parasite et à l'étude de la régulation de leur expression.

La comparaison des résultats obtenus lors du clonage du gène *GRA2* avec ceux des autres molécules GRA a permis de montrer que toutes les protéines de granules denses contiennent un peptide signal hydrophobe défini selon les critères de von Heijne (Von Heijne, 1986), qui les oriente vers un profil de sécrétion. Cette sécrétion à partir des granules denses intervient naturellement lorsque les tachyzoïtes sont intracellulaires, ce qui semblerait impliquer qu'un signal faisant suite à l'invasion de la cellule-hôte est nécessaire à cette exocytose (Sibley, 1993). Des études récentes ont également permis de mettre en évidence 2 profils de sécrétion à partir des granules denses. Le premier montre une forme classique d'exocytose où les granules denses fusionnent avec la membrane plasmique du Toxoplasme ; ce processus aboutit à l'évacuation du contenu des granules sous forme de matériel amorphe dans la vacuole parasitophore (Dubremetz and Schwartzman, 1993). Des sites d'exocytose prédéterminés mais non identifiés, pourraient ainsi être localisés dans la partie antérieure du parasite. Ce processus de sécrétion, continu pendant tout le développement intracellulaire du parasite, nécessiterait le renouvellement continu de ces granules de sécrétion (Dubremetz and Schwartzman, 1993). Par contre, le second processus de sécrétion, de type régulé, interviendrait juste après l'invasion de la cellule-hôte, à la phase postérieure du parasite et fait suite à une migration des granules denses vers le pôle postérieur de la cellule. Un contenu d'apparence membranaire (membranes préformées ou lipides s'associant en structures membranaires) est alors déversé dans la vacuole parasitophore et donnerait naissance au réseau tubulaire (Sibley, 1993). La concentration en calcium à l'intérieur de la vacuole serait d'ailleurs l'un des facteurs essentiels au contrôle de cette sécrétion (Sibley and Boothroyd, 1992a). La mise en évidence de ces deux profils de sécrétion pourrait ainsi laisser supposer l'existence de deux populations de granules denses au sein d'un même parasite (Cesbron-Delauw, soumis). Seules des expériences de double marquage des granules denses observées en microscopie électronique permettraient de répondre à cette interrogation.

L'analyse du profil d'hydrophobicité des protéines de granules denses clonées jusqu'à présent permet d'observer d'autres similarités. En effet, outre la présence de la région N-terminale hydrophobe correspondant au peptide signal, un second et large domaine hydrophobe peut être positionné dans la partie centrale de chacune de ces molécules. Les domaines hydrophobes de GRA4 (Mévelec, Chardès et al., 1992), GRA5 (Lecordier, Mercier et al., 1993) et GRA6 (Lecordier, Dubremetz et al., in preparation) présentent par exemple, les caractéristiques d'une hélice transmembranaire qui assurerait l'association de ces protéines aux membranes du réseau (GRA4 et GRA6) ou de la vacuole ainsi que dans la paroi des kystes (GRA5). De même, les deux hélices amphiphiles prédites à partir de la séquence de GRA2 (Mercier, Lecordier et al., 1993) permettraient de classer cette protéine parmi les protéines amphitropiques, solubles à la fois dans les solutions aqueuses et dans les lipides. La mise en évidence de deux formes de la protéine native, l'une soluble et l'autre membranaire (Sibley and Boothroyd, 1992a), semblerait d'ailleurs conforter cette hypothèse. La présence des deux hélices amphiphiles pourrait également expliquer l'association de cette protéine aux structures tubulo-membranaires du réseau de la vacuole, en permettant la formation d'un pore après homo- ou hétéro-dimérisation de la protéine ou par liaison électrostatique. Les protéines amphitropiques interagissent quelquefois avec des protéines contenant des structures "EF-hand" (Gerke, 1991). Cette observation permettrait d'envisager une interaction fonctionnelle entre GRA2 et GRA1 dont la propriété de fixer le calcium, suspectée par la présence des deux "EF-hands" (α -hélice-boucle- α -hélice), a été démontrée tant pour la protéine native que recombinante (Cesbron-Delauw, Guy et al., 1989; Charif, Darcy et al., 1990). GRA1, composant soluble de la matrice de la vacuole parasitophore, pourrait par exemple, jouer le rôle de "tampon" permettant selon les besoins du parasite, d'apporter le calcium nécessaire pour mobiliser GRA2 et l'associer aux membranes et d'assurer ainsi son activité.

En résumé, le clonage de GRA2, tout comme le clonage des 4 autres gènes de granules denses, a permis d'apporter certaines informations concernant la maturation et le trafic intracellulaire de ces molécules. Il reste néanmoins de nombreuses interrogations.

La comparaison des séquences d'ADNc avec les banques de données n'a par exemple, pas permis de mettre en évidence d'homologie significative avec des protéines dont la fonction est connue. Seules de faibles homologies ont été observées entre GRA4, GRA5 et GRA6 (ces deux dernières protéines présentant d'ailleurs 24% d'homologie entre elles) et des protéines de la matrice extracellulaire. Cette observation pourrait laisser supposer un rôle de ces protéines dans l'élaboration de la structure des membranes de la vacuole ou de la paroi des kystes. Des marquages de parasites intracellulaires par des anticorps anti-GRA3 (Dubremetz, Achbarou et al., 1993) ou anti-GRA5 (Lecordier et col., résultats non publiés), observés en immunofluorescence, ont de plus montré la présence de "filaments" fluorescents qui semblent relier entre elles les vacuoles parasitophores dans la cellule infectée. Ces observations semblent restreintes à GRA3, GRA5 et GRA6 et confirmeraient le rôle structural de ces protéines. La présence de tels "filaments" a déjà été rapportée pour d'autres

protozoaires intracellulaires (*Eimeria tenella*, Zgrzebski, Raether et al., 1993 ; *Plasmodium falciparum*, Taraschi and Pouvelle, 1992) ; ils pourraient constituer un canal reliant la vacuole parasitophore à l'extérieur de la cellule-hôte, canal fermé par un pore. Les protéines sécrétées à partir des rhoptries entreraient également dans la constitution de ce canal dont le rôle exact n'est pas connu.

Les meilleurs pourcentages d'homologie obtenus à partir de la comparaison de la séquence d'ADNc de GRA2 avec les banques de données ont été obtenus avec des protéines de la famille des annexines qui sont des protéines amphitropiques fixant le calcium. Leur fonction au sein de la cellule sont cependant très diverses (Crupton and Dedman, 1990 ; Burn, 1988).

Le ciblage différentiel des protéines de granules denses à l'intérieur de la vacuole parasitophore laisse supposer l'existence de signaux particuliers codés par les protéines elles-mêmes ou présents dans la vacuole et qui dirigeraient ces protéines vers leur destination. Ce processus pourrait faire appel à un mécanisme de translocation des protéines sécrétées au travers de la vacuole (Cesbron-Delauw, soumis). L'existence d'un tel mécanisme n'a pas encore été mis en évidence mais les tubules membranaires du réseau qui traversent la vacuole de part en part, pourraient en constituer des éléments clés .

Les récents progrès réalisés dans la manipulation génétique du Toxoplasme (mise au point d'un système de transfection transitoire du parasite (Soldati and Boothroyd, 1993) ainsi que d'un système de transfection stable (Kim, Soldati et al., 1993) devraient maintenant permettre d'identifier les motifs structuraux des protéines GRA responsables de leur ciblage spécifique. En effet, la transfection de constructions plasmidiques contenant les séquences d'ADNc codant pour ces protéines plus ou moins tronquées et dans lesquelles auront été insérés des marqueurs épitopiques hétérologues devrait permettre d'identifier ces motifs responsables du trafic intracellulaire. De même, l'altération du locus génétique de ces protéines GRA, par recombinaison homologue obtenue à la suite de la transfection stable du parasite à l'aide d'un plasmide contenant un marqueur de sélection (gène bactérien codant pour la tryptophane synthétase par exemple; Sibley, Messina et al., in preparation) flanqué des séquences 5' et 3' du gène *GRA* considéré, devrait permettre de construire des mutants "nuls". L'étude du phénotype (virulence, ...) des souches obtenues nous donnera peut-être des indications sur la fonction des molécules GRA. Quelques observations récentes (Liu, Torpier et al., in preparation) ont fourni des informations concernant le trafic de ces molécules à l'intérieur du parasite. En effet, le traitement des tachyzoïtes par la bréfeldine A (inhibiteur métabolique antibiotique et antifongique qui bloque l'exportation des macromolécules nouvellement synthétisées) conduit à la disparition de l'appareil de Golgi et à la dilatation de l'espace périnucléaire ainsi que du réticulum endoplasmique. Ces effets semblent avoir pour conséquence de réduire le nombre de granules denses à l'intérieur du parasite et d'accumuler les molécules qu'ils contiennent dans les espaces dilatés de la cellule. Ces données semblent donc indiquer que les protéines de granules denses, à leur sortie du réticulum endoplasmique,

transitent par l'appareil de Golgi à l'intérieur duquel elles pourraient par exemple subir des modifications post-traductionnelles telles qu'une O-glycosylation (Schwarz and Tomavo, 1993). Cependant, les signaux protéiques qui permettent leur passage du réticulum vers l'appareil de Golgi d'une part et leur rétention à l'intérieur des vésicules golgiennes (qui par bourgeonnement, pourraient être à l'origine de la formation des granules denses ; Cesbron-Delauw, soumis) d'autre part, restent à identifier. L'alignement des séquences primaires des protéines de granules denses ne permet pas de définir un motif commun qui pourrait être responsable d'une telle destinée. Ce motif serait donc peut être à rechercher par comparaison des structures tridimensionnelles des protéines.

Certaines de ces protéines GRA (GRA1, GRA2, GRA5 et GRA6) sont présentes à la fois dans les granules denses des formes végétatives du parasite (tachyzoïtes) (Charif, Darcy et al., 1990) et des formes enkystées (bradyzoïtes) (Torpier, Charif et al., 1993). GRA2, GRA5 et GRA6 peuvent ainsi être détectées dans la paroi des kystes, GRA5 en association avec la couche externe de cette paroi alors que GRA2 et GRA6 sont préférentiellement associées avec la couche dense aux électrons sous-jacente à cette paroi. Cette observation permet de supposer que les protéines de granules denses, d'abord sécrétées dans la vacuole parasitophore lors de l'invasion de la cellule-hôte, participent aux modifications structurales de cette vacuole puis, lors du processus de différenciation des tachyzoïtes en bradyzoïtes, à la maturation de cette vacuole en paroi kystique (Cesbron-Delauw, soumis).

La caractérisation des gènes de granules denses permet également de montrer que ces molécules, si elles définissent une famille de protéines présentant un trafic intracellulaire apparenté, ne présentent par contre pas de signe particulier au niveau génomique. Ces gènes sont présents en simple copie dans le génome du Toxoplasme et sont de taille normale (1.9 Kb au maximum pour GRA4). Ils sont caractérisés :

- par la présence de régions 5' et 3' transcrites non traduites relativement longues et riches en T (Lecordier, Dubremetz et al., in preparation). Le rôle exact de ces régions "leader" et "tailer" n'est pas connu mais il sera discuté plus loin ;
- par l'absence de régions promotrices classiques des eucaryotes, type TATA- ou CAAT-box (sauf pour le gène *GRA1*), en amont du site de démarrage de la transcription. Par contre, des régions riches en G et C ont été rapportées dans l'amont de ces gènes. Cependant, ces motifs ne correspondent pas aux séquences déjà décrites dans la littérature comme des sites de fixation de facteurs de transcription. Ces observations peuvent en fait être étendues à l'ensemble des gènes de *T. gondii* clonés jusqu'à ce jour et ne semblent donc pas spécifiques des gènes de granules denses.

Parmi les 4 gènes de granules denses clonés jusqu'à présent, seul *GRA2* contient un intron dont les séquences donnatrice et acceptrice d'épissage suivent le consensus AG/gt.....cag/GX. De façon plus générale, il semblerait que la présence d'introns dans les gènes du Toxoplasme soit rare. Seuls les gènes *TUB* et *DHFR* (voir tableau page 42) en

contiennent plusieurs (Nagel and Boothroyd, 1988; Roos, 1993). De façon plus générale, les introns sont rares chez les protozoaires. S'ils existent, leur taille est généralement petite, leur nombre réduit à un seul généralement situé dans la région 5' de la région codante, entre le peptide signal et le reste de la portion codante (Favaloro, Coppel et al., 1986). Ceci n'est pas le cas pour les introns du *Toxoplasme* mis en évidence jusqu'à présent. L'existence de ces introns pourrait également ne pas être fortuite. Ils pourraient par exemple contenir des sites de fixation de facteurs nucléaires régulant la transcription des gènes correspondants. Dans le cas particulier de *GRA2*, nous avons envisagé l'hypothèse d'un épissage alternatif qui aurait par exemple, pu expliquer la présence d'une forme soluble et d'une forme membranaire de la protéine *GRA2* (Sibley and Boothroyd, 1992a). Le criblage de la banque d'expression à l'aide d'une sonde génomique correspondant à l'intron a effectivement permis d'isoler de très nombreux clones mais le séquençage de quelques uns a montré qu'ils correspondent tous à l'ARNm de *GRA2* non épissé ; ces résultats ont été confirmés en northern blot (Mercier et col., résultats non publiés). La séquence de cet intron révèle d'ailleurs la présence de nombreux codons stop dans les trois cadres de lecture.

Les données concernant la régulation de l'expression des molécules *GRA* chez le *Toxoplasme* sont à l'heure actuelle, pratiquement inexistantes. La comparaison des taux de biosynthèse des ARNm et des protéines correspondantes dans différentes souches et dans les différents stades parasitaires renseignerait par exemple sur la relation entre l'expression de ces protéines et la virulence des souches et donc indirectement, sur le rôle de ces protéines dans la pathogénèse ou bien encore sur leur participation aux les mécanismes d'enkystement.

Plus fondamentalement, l'identification des promoteurs de transcription constituait la première étape de l'étude de l'expression des gènes. Comme cela a déjà été rappelé, le stockage des protéines au sein d'organelles identiques ou de même type (granules denses), leur sécrétion simultanée lors de l'invasion de la cellule-hôte, leur trafic apparenté au sein de la vacuole parasitophore sont autant d'arguments qui pourraient suggérer que l'expression de ces molécules est régulée par des signaux communs, tant au niveau de la transcription que de la traduction. Nous pouvions par conséquent supposer que leur transcription serait contrôlée par des promoteurs identiques ou apparentés.

L'étude menée en parallèle sur les 4 gènes de granules denses dont nous disposions au laboratoire (*GRA1*, *GRA2*, *GRA5* et *GRA6*) nous a tout d'abord permis de montrer que les séquences d'ADN responsables de l'activité promotrice sont localisées dans l'environnement génomique proche du site de démarrage de transcription. Les séquences 5' flanquantes minimales requises pour permettre l'expression optimale d'un gène indicateur sont en effet situées entre -47 et -107 pour *GRA1* ou entre -13 et -51 pour *GRA5*. L'analyse de ces séquences a permis de mettre en évidence la présence d'un motif heptanucléotidique (motif consensus A/TGAGACG) répété mais en nombre variable dans l'amont de ces gènes. Il semblerait que deux de ces motifs soient nécessaires pour obtenir une expression optimale des

gènes, la délétion du premier d'entre eux réduisant de façon significative l'expression de la protéine indicatrice. Pour *GRA2*, *GRA5* et *GRA6*, l'effet cumulatif de ces deux motifs répétés en tête-bêche semble net. Par contre, le cas de *GRA1* semble plus compliqué. Si les deux mêmes motifs sont effectivement présents dans les 80 paires de bases situées en amont du "cap site", ceux-ci sont placés dans le sens inverse au sens codant et ils sont de plus séparés par une boîte "CAAT". Si la délétion du premier de ces motifs réduit l'activité de la protéine indicatrice de façon significative, la délétion de la boîte "CAAT" continue de diminuer l'activité CAT mesurée. Cette boîte "CAAT" pourrait donc être en partie responsable de l'importance de l'activité CAT enregistrée pour la construction *GRA1/CAT*.

Mais il semble également, au vu de nos résultats obtenus à l'aide des constructions hybrides *GRA1-GRA6*, que le taux d'expression du gène *CAT* dépende pour une part non négligeable, de la région 5' transcrite non traduite. Nous pouvons par exemple penser que cette région du gène *GRA1* contient une séquence amplificatrice ("enhancer") de la région promotrice ; de la même façon, la région 5' non traduite de *GRA6* pourrait contenir une séquence modératrice ("silencer") de la région promotrice correspondante. Ces régions 5' non traduites des gènes pourraient également jouer un rôle très important au niveau post-transcriptionnel. Plus que sa composition globale en bases (toutes les régions 5' transcrites non traduites du *Toxoplasme* sont riches en motifs "TTT") ou sa longueur, la structure secondaire particulière de l'ARNm pourrait influencer le taux de traduction du message correspondant. (Le rôle des régions 3' non traduites pour la stabilisation des messages aurait pu également être envisagé ; Shaw and Kamen, 1986; Duret, Dorkeld et al., 1993). La formation de structures en "épingles à cheveux" ("hairpin loops") particulièrement stables, juste en aval du début de l'ARNm pourrait par exemple, limiter l'accessibilité du message aux ribosomes et donc diminuer l'efficacité de la traduction (Kozak, 1989). Les différences observées dans les taux d'expression du gène *CAT* placé sous le contrôle des 4 promoteurs *GRA* pourraient donc en partie, être expliquées par la conjonction de tout ou partie de ces processus de régulation tant au niveau transcriptionnel que traductionnel, ce qui impliquerait que la force des promoteurs étudiés ici ne serait pas très différente.

A l'heure actuelle, nous manquons de données pour conclure quant à la spécificité des promoteurs *GRA* et plus particulièrement, quant à la spécificité de la séquence consensus mise en évidence. En effet, l'analyse des quelques régions 5' flanquantes publiées permet de retrouver ce motif, répété dans l'amont des gènes *TUB* (motif consensus présent une seule fois en sens direct) et *SAG1* notamment. Dans ce cas, le motif consensus est répété cinq fois en sens direct mais il fait partie d'un élément de contrôle de la transcription de taille plus importante. L'importance du motif A/TGAGACG dans cet élément de contrôle n'a pas été remarquée (Soldati et Boothroyd, résultats non publiés). Les seules autres données fournies par la littérature en matière de promoteurs chez le *Toxoplasme*, sont celles de D. Roos qui rapporte que le gène de la DHFR-TS, à l'encontre des autres gènes DHFR des Mammifères, ne semble pas contenir de motifs SP1 (Kadonaga, Jones et al., 1986) dans les 100-300 nucléotides situés en amont du codon ATG d'initiation de la traduction. Sur la base de ces

premiers résultats obtenus pour les gènes *GRA* et de ces observations, il serait donc prématuré de conclure que peu ou aucun des gènes de ce protozoaire ne correspond aux gènes "classiques" transcrits par l'ARN polymérase II, sous la dépendance des signaux "TATA" et "CAAT". Seules, la caractérisation de nouveaux promoteurs et la purification des ARN polymérases du parasite nous apporteront des éléments de réponse. Il faut en effet souligner qu'à l'heure actuelle, aucune enzyme du complexe de transcription, ARN polymérase ou facteurs de transcription, n'a encore été identifiée ou caractérisée.

Les perspectives offertes par notre travail dans ce domaine, sont donc d'abord de visualiser, par des expériences de retard sur gel, les protéines nucléaires se fixant sur les séquences promotrices mises en évidence. La seconde étape serait de purifier ces protéines. Nous n'avons à ce sujet, aucune idée de leur nature. Les motifs consensus mis en évidence en amont des gènes *GRA*, par leurs caractéristiques, pourraient peut-être évoquer les motifs SP1 (Dyanan and Tjian, 1985; Kadonaga, Jones et al., 1986). Des expériences de liaison entre ces motifs introduits artificiellement dans des séquences oligonucléotidiques aléatoires et des facteurs SP1 purifiés pourraient nous permettre par exemple de vérifier ou d'infirmer cette hypothèse.

Plus généralement, la transfection transitoire de cellules eucaryotes telles que des cellules COS, par des plasmides contenant un gène indicateur placé sous la dépendance des promoteurs des gènes *GRA* nous permettrait de savoir si les signaux promoteurs de transcription du Toxoplasme sont reconnus comme tels par les cellules eucaryotes de Mammifères. De plus, la quantification de l'activité promotrice en fonction de différents stimuli (par exemple, concentration en cations divalents Ca^{2+} et Mg^{2+}) nous renseignerait sur l'éventuelle inductibilité de ces promoteurs.

A des fins plus appliquées, l'utilisation des promoteurs à des fins vaccinales peut également être envisagée. En effet, les stratégies vaccinales basées sur la recherche d'un vaccin sous-unité produit par génie génétique n'ont pas souvent été couronnées de succès dans le domaine des maladies parasitaires. De nombreux problèmes sont en effet rencontrés lors de l'expression d'antigènes dans des systèmes d'expression hétérologue quels qu'ils soient (*E. coli*, cellules eucaryotes, baculovirus...). Souvent laborieuse, la production de molécules recombinantes ne permet généralement pas de restaurer les propriétés physico-chimiques de l'antigène natif, du fait notamment de modifications post-traductionnelles inexistantes ou différentes de celles acquises naturellement. De nombreux efforts ont ainsi été conduits pour l'expression en système hétérologue de SAG1, l'antigène majeur de surface du parasite (Burg, Perelman et al., 1988). Cet antigène constitue en effet un candidat vaccinal de choix et rentre majoritairement dans la composition des kits de diagnostic commercialisés actuellement. Très récemment, Xiong et col. ont rapporté l'expression de cet antigène dans un système viral délivrant le gène à l'intérieur de la cellule infectée (Xiong, Grieve et al., 1993). La protéine

obtenue par cet intermédiaire, bien que restaurant les épitopes de la protéine naturelle, ne conserve pourtant pas toute son antigénicité.

Pour pallier ces problèmes, le projet de notre laboratoire est maintenant d'utiliser le *Toxoplasme* lui-même comme vecteur d'expression et de production d'antigènes de granules denses d'intérêt diagnostique et prophylactique mais également d'antigènes hétérologues. Ces espoirs sont sous-tendus par de récents progrès développés récemment dans le domaine de la manipulation génétique du parasite (techniques de transfection transitoire et de transfection stable ; Soldati and Boothroyd, 1993; Kim, Soldati et al., 1993) ainsi que par la facilité de propager le *Toxoplasme in vitro*. L'utilisation de la région 5' du gène *GRA1* pourrait ainsi être envisagée pour "sur-exprimer" les parties hydrophiles des molécules *GRA1*, *GRA2* et *GRA6* dont les potentialités diagnostiques ont été soulignées au cours de ce travail. Elle pourrait également être appliquée à la "sur-expression" de l'antigène *SAG1* dont le repliement "naturel" permettrait de restaurer complètement les propriétés antigéniques et immunogéniques de l'antigène natif.

A plus long terme, ce travail permettrait également d'envisager l'utilisation du *Toxoplasme* comme modèle d'étude de vaccination contre les agents parasitaires tels que *Plasmodium*, dont le développement intracellulaire a lieu au sein d'une vacuole parasitophore.

4ème PARTIE

MATERIEL ET METHODES

I- CLONAGE DU GENE CODANT POUR L'ANTIGENE GRA2

1. BANQUE D'ADNC

a) Purification de l'ARN total de tachyzoïtes

Après stimulation des tachyzoïtes 1 h. à 37°C en présence de 10% SVF, ceux-ci sont lysés par une solution de lithium-urée, comme décrit par Auffray et Rougeon (Auffray and Rougeon, 1980) afin de précipiter sélectivement l'ARN. L'ARN est ensuite purifié par extraction phénolique et précipité à l'éthanol en présence d'Acétate de Sodium 2M pH 4.5.

b) Construction de la banque d'ADNc

Cette banque d'expression a été construite dans le vecteur phagique λ ZapII, à l'aide du kit "Zap cDNATM synthesis" (Stratagène), selon les indications fournies par le fabricant.

- Synthèse de l'ADNc

Les ARNm polyA⁺ sont purifiés à partir de 600 μ g d'ARN total de tachyzoïtes (souche RH), sur une colonne d'oligo-dT cellulose (Kit "Poly(A) QuickTM mRNA Purification", Stratagène, La Jolla, CA, USA).

La synthèse du premier brin d'ADNc est réalisée par rétro-transcription de 5 μ g d'ARNm polyA⁺, à l'aide de la MMLVRT (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase) et d'une amorce oligonucléotidique contenant un site XhoI en 5' et une séquence poly-dT en 3'. La synthèse du second brin d'ADNc s'effectue à l'aide de l'ADN Polymérase I, par "Nick-Translation". Après ligation en 5' d'un adaptateur EcoRI et digestion en 3' par XhoI, les ADNc les plus longs sont sélectionnés par chromatographie de tamisage moléculaire, sur une colonne Ultrogel d'acrylamide-agarose (Ac-A34 : 20.000-350.000, IBF Biotechnics) puis ligués dans les sites EcoRI-XhoI du polylinker de λ ZapII. Les inserts d'ADNc viennent ainsi interrompre le cadre de lecture du gène LacZ codant pour la β -galactosidase, ce qui peut permettre la synthèse d'une protéine de fusion (β -galactosidase (4 kDa)-protéine clonée).

- Empaquetage et amplification

Les produits de ligation sont empaquetés dans les protéines phagiques, à l'aide du kit "GigapackTM Gold Packaging Extract" (Stratagène), donnant naissance à une banque de phages recombinants dont le titre est de 1×10^6 . Les phages sont ensuite amplifiés dans des bactéries *Escherichia coli*, souche PLK.F'.

c) Criblage par expression à l'aide de l'AcMc TG17-179

Obtention de bactéries compétentes pour l'infection par les phages λZapII

Les bactéries *E. coli*, souche XLI-Blue (RecA⁻) sont utilisées pour amplifier les phages λZapII. Le culot bactérien issu d'une culture en phase exponentielle de croissance est repris par du MgSO₄ 10mM de façon à obtenir une DO₆₀₀ égale à 2.

Criblage par expression

Une fraction aliquote de la banque d'ADNc est mise en contact avec les bactéries-hôtes XLI-Blue rendues préalablement compétentes ; l'ensemble est ensuite étalé sur milieu NZY-Agar. Après 2 h. à 42°C, des filtres de nitrocellulose imbibés d'IPTG 10mM sont déposés à la surface des tapis bactériens. Après une nuit d'expression des protéines de fusion à 37°C, les filtres sont saturés 10 min. à température ambiante en PBS 10mM pH8-Lait écrémé 5% puis incubés pendant 2 h. à température ambiante, avec l'AcMc TG17-179 anti-GRA2 (Charif, Darcy et al., 1990) dilué 1/500 dans du PBS-Lait. Après 3 lavages de 10 min. en PBS-Tween 20 0.05%, les filtres sont incubés 2 h. avec un sérum anti-IgG (H+L) de souris marqué à la peroxydase (Diagnostics Pasteur) dilué 1/500 en PBS.

d) Excision des clones sous forme de phagemide pBluescript

La coinfection de bactéries XLI-Blue par les phages λZapII et R408 (phage "helper" de type filamenteux, Stratagène) pendant 3 h. à 37°C permet la synthèse d'un phagemide simple brin contenant l'insert d'ADNc exogène. Après élimination des bactéries par chauffage 20 min. à 70°C, les phagemides infectieux sont mis en contact avec de nouvelles bactéries compétentes puis étalés sur milieu nutritif LB contenant un agent de sélection (Ampicilline 100 µg.ml⁻¹). Les clones issus de la transformation contiennent le phagemide pBluescript recombinant double brin, se répliquant comme un plasmide dans les bactéries transformées.

e) Production des monobrans pBluescript

Les phagemides pBluescript double brin, tout comme des phages filamenteux, gardent la possibilité de produire un ADN monobrin. Pour cela, une culture du clone pBluescript en phase exponentielle (milieu de culture : Superbroth) est diluée de façon à obtenir une DO₆₀₀=0.05 puis remise en culture environ 45 min. afin d'obtenir une DO de 0.1. Le phage "helper" R408 est alors inoculé dans la culture à raison de 10 phages "helper" pour une bactérie (déjà infectée par le phagemide pBluescript). Après une nuit de co-culture, les bactéries sont détruites par chauffage 15 min. à 65°C. Les phages libérés dans le surnageant sont précipités pendant 30 min. à température ambiante, par une solution d'Acétate de Sodium 3.5M pH7.5-PEG 20% dilués dans du tampon SM. Le culot de phages est ensuite repris en

TE et les ADN monobrin qu'ils contiennent sont purifiés par extraction phénolique et précipitation à l'éthanol.

f) Séquençage

Les matrices d'ADN simple brin produites à partir des phagemides pBluescript sont ensuite utilisées pour le séquençage des inserts d'ADNc sélectionnés, selon la méthode de terminaison de chaînes décrite par Sanger et coll. (Sanger, Nicklen et al., 1977), à l'aide des kits "Multiwell Microtitre Plate DNA Sequencing System" utilisant des déazadidéoxynucléotides, l' $[\alpha^{35}\text{S}]$ -dCTP, la T7 DNA polymérase ou la Taq Polymérase (Amersham). Après dénaturation 5 min. à 95°C, les échantillons sont déposés sur gel de polyacrylamide 6%, Urée 8.4M en tampon TBE pH7.9. Après une migration de 3 h. 30 min. environ sous 60 Watts, le gel est fixé 10 min. dans un fixateur constitué de 10% Méthanol et 10% Acide Acétique, séché sous vide et autoradiographié à température ambiante (film " β -Max", Amersham).

2. BANQUE GÉNOMIQUE

a) Purification de l'ADN génomique de tachyzoïtes

Les tachyzoïtes sont purifiés à partir d'ascite de souris infestées par la souche RH. L'ADN est extrait des tachyzoïtes selon la méthode décrite par Johnson et al. (Johnson, Dubey et al., 1986) : après lyse des parasites, l'ADN est purifié sur gradient de chlorure de césium. L'utilisation du colorant de Hoechst 3358 (Boehringer) comme intercalant permet de séparer aisément l'ADN des deux espèces (ADN de Toxoplasme et ADN génomique de souris).

b) Construction de la banque génomique

L'ADN génomique de tachyzoïte (souche RH) a été digéré partiellement par l'enzyme de restriction MboI. Les fragments de restriction de 15 à 20 kb ainsi générés ont ensuite été insérés dans le site BamHI du vecteur phagique EMBL3 (Cesbron-Delauw, Guy et al., 1989).

c) Criblage par hybridation moléculaire à l'aide d'une sonde radiomarquée d'ADNc

Obtention de sondes d'ADNc radiomarquées à l' $[\alpha^{32}\text{P}]$ dCTP, par la technique de "random priming"

15 à 30 ng d'insert d'ADNc sont dénaturés 10 min. à 95°C puis marqués à l' $[\alpha^{32}\text{P}]$ -d-CTP (Amersham), de façon aléatoire, grâce au fragment de Klenow de l'ADN polymérase I

d'*E.coli* (méthode de "random priming"). La réaction s'effectue 30 min. à 37°C ou une nuit à température ambiante. Elle est arrêtée par addition de TE ; les nucléotides libres sont éliminés par précipitation à l'éthanol froid en présence d'ADN entraîneur (ADN de sperme de hareng, Boehringer).

Criblage de la banque génomique

Une fraction aliquote de la banque génomique construite dans le vecteur EMBL3 est mise en contact avec des bactéries-hôtes *E.coli*, souche P2.392, rendues compétentes par MgSO₄ puis est étalée une nuit sur milieu nutritif NZY-Agar. L'ADN des plages de lyse transféré sur nitrocellulose est dénaturé et fixé comme décrit ci-dessus.

Les filtres sont ensuite préhybridés 45 min. à 65°C, en 5xDenhardt-6.6xSSC puis hybridés une nuit à 65°C avec la sonde radioactive, en présence d'ADN de sperme de Hareng 20µg.ml⁻¹ (Boehringer). Les hybridations non spécifiques sont éliminées par lavage des filtres 2 fois 15 min. en 0.1xSSC-0.1%SDS puis 2 fois 30 min. à 65°C dans le même tampon. Les filtres, après séchage, sont autoradiographiés à -70°C (Hyperfilm MP, Amersham), entre deux écrans amplificateurs.

d) Sous-clonage en vecteur plasmidique pUC

Purification de l'ADN des phages EMBL3

Les phages recombinants sélectionnés à la suite de l'hybridation sont préparés selon le protocole standard décrit par Sambrook et col. (Sambrook, Fritsch et al., 1989), par ultracentrifugation sur un gradient de CsCl. Après digestion des coques phagiques par la protéinase K, les ADN sont purifiés par extraction phénolique et précipitation à l'éthanol.

Ligation-Transformation

2 à 3 µg d'ADN phagique sont digérés pendant 2 à 3 h. à 37°C par l'enzyme de restriction permettant de libérer un fragment contenant le gène étudié complet. La digestion est vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose d'une fraction aliquote. Le reste est concentré par précipitation à l'éthanol puis ligué dans les bras d'un vecteur pUC18 ou 19 (Pharmacia). Le vecteur recombinant est ensuite introduit dans des bactéries *E. coli*, souche JM109, rendues compétentes pour la transformation par la méthode au TFB (Sambrook, Fritsch et al., 1989).

Criblage des bactéries transformées

Les clones issus de la transformation sont repiqués en réplique double. L'empreinte réalisée sur nitrocellulose à partir de l'une de ces boîtes est hybridée avec une sonde ADNc marquée à la digoxigénine.

Les clones positifs sont réamplifiés et une mini-préparation de leur ADN est réalisée par la méthode de lyse alcaline (Sambrook, Fritsch et al., 1989), de façon à vérifier leur carte de restriction.

Amplification du clone plasmidique sélectionné

L'ADN plasmidique est préparé en vue d'une analyse plus fine ou de clonages ultérieurs, à l'aide du kit "Midi-Quiagen" (Diagen). Ce kit permet de préparer 100 à 200 µg d'ADN à partir de 100 ml de culture, sur la base de la méthode de lyse alcaline des bactéries.

e) Sous-clonage en vecteur phagique M13

Les inserts génomiques clonés en vecteur plasmidique sont libérés par digestion enzymatique ; une fraction aliquote de la digestion est vérifiée sur gel d'agarose puis l'ensemble de la digestion est ligué dans les bras du vecteur M13 mp18 ou M13 mp19 (Pharmacia). Les vecteurs recombinants sont ensuite introduits dans les bactéries *E. coli*, souche JM109, selon le protocole de transformation au TFB déjà décrit.

f) Séquençage

L'ADN monobrin correspondant aux phages M13 est obtenu après infestation d'*Escherichia coli*, souche TG1, par les phages recombinants. La technique de préparation des monobrins, matrices des réactions de séquence, est sensiblement identique à celle déjà décrite pour les monobrins pBluescript.

Les inserts génomiques sous-clonés en M13 mp19 et longs de plusieurs Kb, sont tout d'abord soumis à une digestion progressive, à l'aide de la T4 DNA polymérase ("Kit Cyclone I, Rapid Deletion Subcloning Biosystem for M13 Derivatives", IBI, Eastman Kodak Company). Cette délétion qui s'effectue à partir d'un site enzymatique unique, permet de générer des mutants de délétion qui se recouvrent tous en une de leur extrémité. Ceci permet de séquencer rapidement de très longs fragments d'ADN en utilisant la même amorce oligonucléotidique (dans ce cas, l'amorce M13-40). Quelques amorces oligonucléotidiques internes permettent le cas échéant, de compléter la séquence.

La réaction de séquence s'effectue à l'aide du kit "Multiwell Microtitre Plate DNA Sequencing System" (Amersham) comme cela a déjà été décrit pour le monobrin pBluescript.

3. ETUDES COMPLEMENTAIRES

La cartographie du gène est précisée grâce à l'utilisation de plusieurs techniques faisant appel à l'hybridations de sondes ADNc marquées à l' $[\alpha^{32}\text{P}]\text{-dCTP}$.

a) Southern Blot

L'ADN génomique de tachyzoïtes est digéré par différentes enzymes de restriction, à raison de 3 µg d'ADN par digestion. Les produits de digestion sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose 0.8% en TAE. Après coloration au BEt, l'ADN contenu dans le gel est transféré par capillarité, selon la technique standard de Southern (Sambrook, Fritsch et al., 1989)(Southern, 1975), sur une membrane de Nylon non chargée (Hybond-N, Amersham). L'ADN est ensuite fixé de façon covalente à la membrane, 3 min. sous UV.

Après une préhybridation d'une heure à 65°C, en 5xDenhardt-6.6xSSC, la sonde d'ADNc radiomarquée est ajoutée au tampon de préhybridation et est incubée une nuit à 65°C avec le blot. Le blot est alors lavé deux fois 15 min. à température ambiante, en 1xSSC-0.1% SDS puis deux fois 15 min. à 65°C, en 0.1xSSC-0.1% SDS. La membrane égouttée est exposée contre un Hyperfilm MP (Amersham) à -70°C, entre deux écrans amplificateurs.

b) Protection à la nucléase S1

Cette expérience permet de mettre en évidence la présence d'intron(s) dans le gène étudié. L'ADN génomique est apparié à l'ARN ; les boucles d'ADN non appariés et donc non protégés sont ensuite digérés par la nucléase S1 et les fragments d'ADN appariés sont mis en évidence par hybridation. 100 µg d'ARN total de tachyzoïtes et 250 ng d'insert génomique simple brin (matrice M13) sont coprécipités à l'acétate de sodium 3M pH5.2, en présence de 10 µg d'ARNt entraîneur (ARNt de Levure, Boehringer). Le culot est repris dans 3 µl d'eau, 24 µl de formamide désionisée et 3 µl de tampon 10xBERK/BVF (NaCl 4M, Pipes 0.4M pH6.7, EDTA 10mM pH8.0). Après dénaturation des acides nucléiques 10 min. à 70°C, l'hybridation entre l'ADN génomique monobrin et l'ARN est réalisée au moins 5 h. à 50°C. Les fragments d'ADN génomique non appariés à l'ARN et donc non protégés sont ensuite digérés 1 h. à 37°C, par une solution contenant 60 U de Nucléase S1 (Boehringer), 3.3 µg d'ADN de sperme de hareng (Boehringer) préalablement dénaturé dans 150 µl d'eau et 150 µl de tampon 2xS1 BVF (NaCl 1.5M, Acétate de Sodium 0.6M, ZnSO4 10mM, Glycérol 10%). Après extraction phénolique et précipitation à l'éthanol, le culot contenant les complexes ADN/ARN est repris en TE puis l'ARN est digéré 15 min. à 37°C par la RNase "DNase free" (Boehringer).

Les échantillons sont alors soumis à une électrophorèse en gel d'agarose 1%, en tampon TAE. Le gel est coloré au BEt puis transféré sur Hybond N (Amersham) par la technique classique de Southern blot (Southern, 1975). Les fragments qui ont été protégés contre la digestion nucléasique sont visualisés à la suite d'une hybridation de la membrane avec une sonde d'ADNc marquée à l'[α-³²P]-dCTP.

c) Northern Blot

10 µg d'ARN total de tachyzoïtes sont séparés par électrophorèse en gel d'agarose-formaldéhyde. La migration s'effectue 1 h. à 60V puis 2 h. à 100V en tampon MOPS 50mM, EDTA 1mM contre des standards d'ARN. Après coloration du gel au BET, l'ARN est transféré par capillarité sur une membrane de nylon (Hybond N, Amersham), selon la technique standard (Alwine, Kemp et al., 1979; Sambrook, Fritsch et al., 1989).

La préhybridation et l'hybridation avec les sondes d'ADNc s'effectue à 42°C, dans un tampon contenant 40% formamide, NaCl 0.9M, Phosphate de Sodium 50mM pH6.5, EDTA 2 mM, Denhardt₄, ADN de sperme de Hareng 50µg.ml⁻¹, SDS 1%, Sulfate de dextran 5%. Après l'hybridation, les membranes sont lavées 2x15 min. à température ambiante, en 0.5xSSC-0.1% SDS puis 2x15 min. à 65°C, dans les mêmes conditions. Le filtre égoutté est autoradiographié à -70°C contre un Hyperfilm MP (Amersham), entre deux écrans amplificateurs.

d) Extension d'amorce

Afin de positionner dans le génome le site de démarrage de la transcription, une réaction de transcription réverse est réalisée sur l'ARN à l'aide d'une amorce oligonucléotidique dont la séquence est choisie dans la partie 5' de l'ADNc. En général, la réaction est réalisée à l'aide de plusieurs oligonucléotides différents, distants entre eux de quelques dizaines de paires de bases.

Obtention d'une sonde oligonucléotidique [$\gamma^{32}\text{P}$]-ATP (réaction de kination)

Les oligonucléotides utilisés au cours de cette réaction ainsi que ceux utilisés pour les PCR (paragraphe) ont été produits à l'aide du synthétiseur d'oligonucléotides Cyclone+ (Milligène, France). Ils sont purifiés sur gel dénaturant de polyacrylamide-Urée à 20%. La bande majeure est éluée une nuit à 37°C en tampon Acétate de Magnésium 10mM, Acétate d'Ammonium 0.5 M. Les oligonucléotides sont purifiés sur colonne Sep-Pak C18 Cartridge (Millipore), élués par l'éthanol 100%, séchés sous vide et repris dans l'eau distillée.

15 pmoles d'oligonucléotide sont marquées au [$\gamma^{32}\text{P}$]-ATP (Amersham) pendant 30 min. à 37°C, à l'aide de la Poly Nucléotide Kinase du phage T4 (Boehringer). Après élimination des nucléotides libres par précipitation à l'éthanol en présence d'ARNt de Levure (ARN entraîneur, Boehringer), le nombre de cpm est compté.

Extension d'amorce

10⁶ cpm de la sonde oligonucléotidique sont mis en contact avec 10 µg d'ARN total et portés pendant 3 min. à 80°C. La température est ensuite redescendue doucement jusqu'au T_m de chaque oligonucléotide, ceci permettant une hybridation stable de l'oligonucléotide sur la séquence complémentaire de l'ARN. La moitié de cette solution est soumise à l'action de la

transcriptase réverse (MMLVRT, Boehringer) 2 fois une heure à 42°C, en rajoutant de l'enzyme après la première heure.

Après extraction phénolique et précipitation à l'éthanol en présence d'ARNt entraîneur, le culot d'ADN est repris dans le bleu d'échantillon et déposé sur un gel de séquençage (Acrylamide 6%-Urée 8.4M, TBEx1), aux côtés d'une réaction de séquence réalisée sur l'ADN génomique monobrin et amorcée si possible par le même oligonucléotide. La réaction de séquence permet de calibrer le gel de séquence et donc de déterminer le nombre exact de bases réverse-transcrites à partir de l'ARN. Le gel est ensuite fixé, séché et autoradiographié (Hyperfilm MP, Amersham), tout comme un gel de séquence.

II- PRODUCTION ET PURIFICATION DES PROTEINES PARASITAIRES ET RECOMBINANTES

1. OBTENTION DES PARASITES (TACHYZOITES DE LA SOUCHE RH)

La souche pathogène RH a été isolée en 1939, aux Etats-Unis, d'un enfant mort d'encéphalite toxoplasmique (Sabin, 1941). Elle est entretenue depuis son isolement, par passages successifs chez la souris (inoculation par voie intrapéritonéale).

- Isolement de tachyzoïtes à partir d'ascites de souris infectées

Les tachyzoïtes de *Toxoplasma gondii* sont obtenus par lavage du péritoine de souris Swiss/OF1 (IFFA CREDO, L'Arbresle, France) infectées 3 jours auparavant, par la souche RH. Les parasites sont lavés en R.P.M.I-1640 (Gibco BRL, Paisley, Ecosse), filtrés sur des membranes de polycarbonate 3 µm (Nuclepore, Pleasanton, CA, USA) puis lavés deux fois dans le même milieu.

- Isolement de tachyzoïtes à partir de cellules en culture

Les tachyzoïtes issus des ascites de souris peuvent servir à infecter un tapis de cellules Hep-2 (cellules épithéliales humaines, carcinome de larynx), en culture dans du R.P.M.I-1640 (Gibco BRL) contenant 10% de SVF décomplémenté (Gibco BRL). Les parasites sont alors recueillis après 4 jours de multiplication en culture puis filtrés sur papier (Schleicher et Schuell, Dossel, Allemagne).

2. WESTERN BLOTS D'EXTRAIT TOTAL DE TACHYZOÏTES ET DE PROTÉINES RECOMBINANTES

a) Obtention d'extraits de protéines de tachyzoïtes

Les extraits totaux de tachyzoïtes sont obtenues par mélange, en quantité égale de protéines, de la fraction soluble (fraction S2) et de la fraction membranaire de tachyzoïtes solubilisée par le détergent CHAPS.

- Préparation de l'extrait soluble : fraction S2

Les tachyzoïtes obtenus en culture de cellules Hep-2 sont tout d'abord filtrés sur papier (Schleicher et Schuell) afin d'éliminer tous les débris cellulaires. Ils sont ensuite lavés deux fois en tampon PBS 10 mM pH7.4. Le culot final de parasites est remis en suspension dans de l'eau distillée, à concentration finale de 6×10^8 tachyzoïtes.ml⁻¹, en présence de 1mM de PMSF (Sigma, Dorset, Grande-Bretagne). La suspension est soumise aux ultrasons 4 fois 1 min., congelée à -20°C puis passée à l'X-Press (LKB, Uppsala, Suède) avant d'être centrifugée 2 h. à 36.000xg. Le surnageant, qui contient les antigènes solubles (fraction S2) est additionné de 100 U.ml⁻¹ d'aprotinine (Sigma).

- Préparation de l'extrait membranaire : fraction CHAPS

Le culot issu de la centrifugation précédente est additionné de détergent CHAPS (Fluka, Buchs, Suisse) 9.7 mM en tampon PBS 10 mM pH7.2, en présence d'inhibiteurs de protéases : PMSF 0.04 mM (Sigma), EDTA 0.25 mM (Prolabo, Paris, France), TLCK 0.2 mM (Sigma) et TPCK 0.2 mM (Sigma). Le mélange est mis sous agitation douce, une nuit à 4°C. Après une centrifugation de 30 min. à 12.000xg, le surnageant contenant les antigènes membranaires solubilisés par le détergent est filtré sur membrane Millipore 0.22 µm (Millipore corp., Bedford, MA, USA) puis conservé à -70°C.

b) Obtention de protéines recombinantes

- Expression dans le système pGEX, *E. coli*

L'expression des protéines dans le vecteur pGEX (*E. coli*) est détaillée au paragraphe II-6. 4 µg de protéines recombinantes sont déposés par piste de gel.

- Production des lysogènes issus du clone d'ADNc FM16

Les lysogènes sont produits dans la souche *E. coli* Y1089 à partir du clone initial FM16 (Cesbron-Delauw, Boutillon et al., 1992), selon le protocole décrit par Huynh et col. (Huynh, Young et al., 1985). L'induction de la production de la protéine recombinante en fusion avec la β-galactosidase est induite 20 min. à 45°C par addition d'IPTG 10 mM. Après une heure de culture à 37°C, les bactéries sont lysées par une solution de Tris-HCl 0.01M pH8, EDTA 1

mM, NaCl 10 mM, Lysozyme 4 mg.ml⁻¹, MgCl₂ 0.01 M, TritonX100 0.2% puis traitées 30 min. à 37°C par la DNase I.

c) Analyse immunochimique des extraits protéiques

- Electrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE)

La séparation des différents extraits de protéines est réalisée en présence de SDS, selon la méthode de Laemmli (Laemmli, 1970), sur un gel d'acrylamide 13%. Le gel est calibré par la migration parallèle de standards de protéines précolorées (BRL, Gaithesburg, MD, USA).

- Immunoelectrotransfert

Après séparation électrophorétique (SDS-PAGE), les protéines sont transférées par électroblot, sur une membrane de nitrocellulose (0.45 µm d'épaisseur) (Schleicher et Schuell) selon la technique de Towbin et al. (Towbin, Staehelin et al., 1979). Après saturation, les membranes sont incubées avec les sérums et anticorps monoclonaux dilués en PBS-Lait pendant une nuit à 4°C, puis avec l'anticorps secondaire marqué à la peroxydase dilué au 1:500 dans du PBS (anti-IgG (H+L) de souris, Diagnostics Pasteur, Marnes-la-Coquette, France) pendant deux heures à température ambiante. La révélation s'effectue à l'aide du 4-chloro-1-naphtol (Biorad).

3. PURIFICATION DE LA PROTÉINE NATIVE GRA2 PAR HPLC EN PHASE INVERSE (COL. DR. P. MAES ; CNRS URA 1309)

1x10¹⁰ tachyzoïtes (souche RH) sont lavés deux fois en PBS pH7.2. Après centrifugation à 1.000xg pendant 10 min., le culot est incubé une nuit à 4°C sous agitation douce, à une concentration de 10⁹ parasites.ml⁻¹ en tampon TEN (Tris-HCl 10mM pH7.4, EDTA 2mM, NaCl 150mM) contenant 1% de NP-40, 100 U.ml⁻¹ d'aprotinine et 40 µM de PMSF. Après centrifugation à 3.500xg pendant 20 min., le surnageant est filtré sur une membrane Millipore 0.22µm (Millipore Corp.). Les protéines de tachyzoïtes ainsi extraites par le NP-40 sont alors soumises à une HPLC en phase inverse sur une colonne Vydac C18 (300 Å, 7 µm, 500x9 mm). Huit ml de l'extrait de protéines sont déposés sur la colonne à 0% B (solvant A : 0.5% (v/v) de TFA dans l'eau ; solvant B : 25/75/0.45 (v/v/v) d'eau/ acetonitrile/TFA). Après 10 min. d'élution isocratique, les protéines sont éluées par un gradient 0-100% de solvant B sur une période de 180 min., avec une vitesse d'élution de 2 ml.min.⁻¹ ; elles sont ensuite détectées par mesure de l'absorbance à 215 nm. Afin de localiser l'antigène GRA2, chaque fraction HPLC est lyophilisée (lyophilisateur SMH15, Usifroid, Maurepas, France) puis reprise dans 100 µl de TEN/PBS 10 mM pH8 (v/v). 1 µl de chaque fraction est testée en dot-blot contre l'AcMc TG17-179 (Charif, Darcy et al., 1990), comme indiqué par Darcy et col. (Darcy, Deslée et al., 1988).

La pureté des fractions positives en dot-blot est alors contrôlée sur un gel de polyacrylamide en présence de 2-mercapto-éthanol (Laemmli, 1970) coloré au nitrate d'argent (Sambrook, Fritsch et al., 1989) (pp18.56-18.57). Un gel similaire est réalisé puis transféré par électroblot, sur une membrane de nitrocellulose (Shleicher et Schuell) (Towbin, Staehelin et al., 1979). La membrane est développée à l'aide de l'AcMc TG17-179 puis d'un conjugué anti-IgG (H+L) de souris marqué à la peroxydase (Diagnostics Pasteur) dont l'activité est révélée par le 4-chloro-1-naphtol (Biorad).

Les fractions positives et de pureté satisfaisante sont ensuite mélangées et leur concentration en protéines est déterminée selon la méthode développée par Peterson (Peterson, 1977).

4. DIGESTION PAR LA TRYPSINE ET SEQUENÇAGE DES PEPTIDES GENERES (COL. DR. P. MAES ; CNRS URA 1309)

a) Séquencage de la protéine native purifiée par HPLC

La protéine GRA2 native purifiée par HPLC comme décrit ci-dessus ainsi que 100 pmoles de β -galactosidase (Sigma, Saint-Quentin-Fallavier, France) contenant une extrémité N-terminale libre sont déposées sur un gel SDS-PAGE 13% puis transférées par électroblot sur une membrane PVDF (PolyVinylideneDiFluoride, Immobilon P, Millipore). Les bandes correspondant aux deux protéines sont soumises à un séquencage direct (Applied Biosystems 470A Gas Phase Sequencer, Applied Biosystems, Paris, France), selon la méthode décrite par Edman (Edman and Begg, 1967). Les dérivés phénylthioisocyanate d'acides aminés ainsi générés sont analysés sur un système Applied Biosystems 120A RP-HPLC.

b) Séquencage des peptides dérivés de la digestion trypsique de la protéine native

La bande obtenue après migration électrophorétique et electroblotting sur PVDF de la protéine purifiée par HPLC est découpée puis soumise à une digestion trypsique (Trypsin Sequencing Grade, Boehringer, Mannheim, Allemagne) pendant deux jours à 37°C dans un rapport Enzyme/Substrat de 5/100 et en tampon (Tris-HCl 100mM pH8, CaCl₂ 10mM) (Vandekerckhove, Bauw et al., 1985). Les fragments trypsiques générés sont ensuite séparés sur HPLC microbore en phase inverse (Aquapore C18, 7 μ M, 300Å, 250x1mm). Après 40 min. d'élution isocratique, les fragments trypsiques sont élués par un gradient 0-37% de solvant B pendant une période de 120 min. puis par un second gradient 37-80% de solvant B sur une période de 60 min., avec une vitesse d'élution de 50 μ l.min.⁻¹. Les peptides ainsi obtenus sont alors séquencés selon la méthode d'Edman et leur masse moléculaire est déterminée sur un "Bio-Ion 20, 252 Cf Fission Fragment Ionization Time of Flight Mass Spectrometer" (Applied Biosystems). Pour cela, une fraction aliquote de 5 μ l (10% du volume total) de la solution peptidique est déposée sur une pastille d'aluminium recouverte de

nitrocellulose et le spectre est calculé pendant 25×10^6 évènements de fission (environ 250 min.).

5. ANALYSE DE LA SEQUENCE PRIMAIRE DE LA PROTEINE

Les analyses des séquences déduites des ADNc ont été conduites sur le programme "DNA Star" (DNASTar Inc., Madison, WI, USA) ; les séquences ont été comparées aux banques de données NBRF/PIR (44.900 entrées) et GenBank/EMBL (102.947 entrées).

6. EXPRESSION DE PROTÉINES RECOMBINANTES CHEZ *E. COLI*, DANS LE SYSTÈME PGEX

Le clonage des inserts d'ADNc dans le vecteur d'expression procaryote pGEX permet d'induire la production de protéines recombinantes en fusion avec la glutathion-S-transférase (GST) Sj26 de *Schistosoma japonicum* (Smith and Johnson, 1988). Les protéines de fusion sont ensuite séparées de l'extrait bactérien par affinité sur Glutathion Sépharose 4B (Sigma), avant d'être éluées spécifiquement par compétition avec un excès de glutathion réduit. Des sites de reconnaissance pour des protéases spécifiques ayant été introduits dans le site de clonage, en aval de la GST, il est possible de cliver les protéines de fusion obtenues : les protéines exprimées dans le vecteur pGEX-2T sont clivées par la thrombine alors que les protéines exprimées dans le vecteur pGEX-3X peuvent être libérées par le facteur Xa.

a) Sous-Clonage dans le vecteur pGEX

- Préparation des inserts

Les inserts d'ADNc ou des fragments de restriction dérivés de ces inserts sont séparés des vecteurs plasmidiques qui les contiennent par migration électrophorétique sur gel d'agarose. Les fragments d'intérêt visualisés après coloration au Bromure d'Ethidium sont découpés et purifiés des contaminants agarose par centrifugation au travers de laine de verre siliconée. Les contaminants protéiques sont extraits par le phénol et l'ADN est concentré par précipitation à l'éthanol froid. L'insert est finalement dosé sur un minigel d'agarose.

- Préparation des vecteurs

Le vecteur pGEX-2T ou pGEX-3X (Pharmacia) est choisi selon le cadre de lecture qu'il permet de restaurer après intégration du fragment d'ADNc d'intérêt. Il est ensuite digéré, déphosphorylé 30 min. à 37°C par la phosphatase alcaline (Calf Intestine Alkaline Phosphatase, Pharmacia) en tampon Tris-HCl 50mM pH8, EDTA 0.1mM. L'enzyme, inactivée 15 min. à 65°C, est extraite par un mélange (v/v) de phénol/chloroforme.

- Ligation et transformation bactérienne par les vecteurs recombinants

La ligation des inserts purifiés d'ADNc dans les vecteurs pGEX s'effectue une nuit à 14°C à l'aide de la T4 DNA Ligase (Boehringer) (Sambrook, Fritsch et al., 1989).

Les vecteurs recombinants sont ensuite introduits dans des bactéries (*Escherichia coli*, souche JM109, Stratagène) rendues compétentes pour la transformation à la suite de la fragilisation de leur paroi par traitement au TFB/DMSO/DTT (Sambrook, Fritsch et al., 1989). Les bactéries sont ensuite étalées sur LB-Ampicilline 100 µg.ml⁻¹.

b) Criblage des recombinants

Le criblage des recombinants s'effectue en plusieurs étapes : un premier criblage par hybridation moléculaire avec une sonde nucléique froide permet d'éliminer toutes les colonies faussement positives (n'ayant intégré que le vecteur pGEX natif). Une minipréparation d'ADN des colonies positives permet ensuite de vérifier la taille de l'insert d'ADNc intégré dans le plasmide et éventuellement, son orientation quand les sites de restriction de l'insert le permettent. Enfin, un test d'expression permet de vérifier que les colonies retenues expriment la protéine de fusion, un décalage du cadre de lecture attendu étant fréquemment observé.

- Criblage par sonde froide ("DIG DNA labeling and Detection Kit Non Radioactive", Boehringer)

Les colonies obtenues après une nuit à 37°C sont repiquées en réplique double sur milieu sélectif. Une empreinte sur nitrocellulose (Schleicher et Schuell) est réalisée à partir d'une de ces boîtes. L'ADN des bactéries présentes sur les filtres est dénaturé 5 min. par une solution de NaOH 0.5M-NaCl 1.5M puis neutralisé 10 min. en Tris-HCl 1M pH7.5-NaCl 1.5M. Après rinçage des filtres 10 min. en 2xSSC, l'ADN est fixé covalamment à la nitrocellulose par cuisson 2 h. à 80°C.

La sonde d'ADNc utilisée pour le criblage est marquée par "random priming" à l'aide du kit "DIG DNA Labeling and Detection Kit Nonradioactive" (Boehringer) permettant d'incorporer des déoxyuridine-triphosphate marqués à la digoxigénine (DIG-dUTP).

Après lavages des filtres de nitrocellulose 2 h. à 50°C en 3xSSC-0.1%SDS afin d'éliminer tout débris bactérien, une pré-hybridation est effectuée 2 h. à 65°C en (6xSSC-0.1% N-lauryl Sarcosine-1.25% d'agent bloquant). La sonde froide est ensuite hybridée sur la nuit à 65°C, à raison de 2 à 5 ng.ml⁻¹ dans le même tampon.

Après lavage, la détection des molécules marquées à la digoxigénine se fait par une révélation antigène-anticorps classique, grâce à un anticorps anti-digoxigénine couplé à la phosphatase alcaline. L'activité phosphatasique est révélée par incubation pendant des temps variables (quelques minutes à quelques heures), à l'obscurité, avec les substrats de la phosphatase alcaline (Nitro Blue Tetrazolium et Bromo-4-Chloro Indoyl Phosphate).

- ~~Minipréparation d'ADN par la méthode de lyse alcaline.~~ (Sambrook, Fritsch et al., 1989)

Les colonies sélectionnées à la suite du premier criblage sont remises en culture en milieu liquide, une nuit à 37°C, en présence de l'agent de sélection. Après élimination du milieu de culture par centrifugation, le culot est traité par une solution de Tris-HCl 25mM pH8, EDTA 10mM, Glucose 50mM, lysozyme 2.6 mg.ml⁻¹ puis lysé par NaOH 0.2M, SDS 1%. Les petits acides nucléiques bactériens (plasmides et ARN) sont précipités par l'Acétate de Sodium 3M pH4.8. Après extraction phénolique des protéines contaminantes, les acides nucléiques sont précipités par l'éthanol froid puis digérés par les enzymes de restriction appropriées en présence de RNase (300µg.ml⁻¹).

- ~~Test d'expression~~

Les colonies contenant l'insert de taille attendue sont remises en culture une nuit en LB-Ampicilline puis rediluées au 1/10ème. Après une heure de culture, l'ajout à la culture d'IPTG 0.1mM induit la synthèse des protéines de fusion. Le culot bactérien obtenu après centrifugation est ensuite lysé par une solution de PBS-TEP (PBS pH7.5, TritonX100 1%, EDTA 1mM, PMSF 0.5mM) puis par sonication 2x15 secondes. Toutes ces étapes sont réalisées sur glace et le plus rapidement possible afin d'éviter toute dégradation des protéines de fusion. Le surnageant obtenu après centrifugation de 5 min. à 10.000 r.p.m. est alors mis en contact pendant 5 min. avec une solution de glutathion-agarose (Sigma) équilibrée en PBS. Après centrifugation rapide des billes, celles-ci sont lavées 3 fois en PBS-TEP. Les protéines de fusion qui restent spécifiquement liées au glutathion-agarose sont éluées 3 min. à 100°C en présence de tampon échantillon 2 fois concentré avant d'être déposées sur un minigel d'acrylamide 13%. Après migration électrophorétique, les protéines de fusion sont visualisées par coloration du gel au bleu de Coomassie. Un autre gel, réalisé dans des conditions identiques, est transféré par électroblot sur nitrocellulose et développé à l'aide d'anticorps de souris (AcMc ou sérums) dirigés contre la partie protéique clonée puis d'un conjugué anti-IgG (H+L) de souris marqué à la peroxydase.

c) Production et purification des protéines recombinantes

La production et la purification des protéines recombinantes est adaptée du protocole décrit par Smith et Johnson (Smith and Johnson, 1988).

Une préculture de nuit (200 ml) du clone bactérien est diluée dans 2 litres de milieu LB-Ampicilline pendant 1 heure 30 min. Tout comme pour le mini-test d'expression, la synthèse des protéines de fusion est induite pendant une heure par addition d'IPTG 0.1 mM. Après centrifugation des bactéries 10 min. à 3.000 r.p.m., celles-ci sont lysées par 20 ml de PTI froid (PBS-TritonX100 1%-inhibiteurs) avant d'être soniquées par 5 cycles de 25 secondes. Le surnageant obtenu après centrifugation de 15 min. à 10.000 r.p.m. est mis en contact avec 2 ml de billes glutathion-agarose préalablement équilibrées en PTI. (Il est à noter que le culot bactérien obtenu après la centrifugation peut être conservé à -20°C et réextrait deux fois, la

sonication des bactéries n'étant jamais complète). La fixation des protéines au glutathion-agarose est assurée par agitation douce 5 min. à 4°C. Les billes qui ont été centrifugées 2 min. à 1.000 r.p.m. sont ensuite lavées trois fois dans un grand volume de PTI. L'éluion des protéines de fusion est assurée par addition d'une solution de glutathion 5mM en Tris-HCl 50mM pH8 quelques minutes sur les billes.

Une fraction aliquote de la production est passée sur gel de polyacrylamide afin d'une part, de contrôler le poids moléculaire des protéines et leur état de dégradation et d'autre part, d'estimer la concentration des protéines produites, par comparaison avec une gamme étalon de BSA.

Les inhibiteurs employés lors de la production des protéines recombinantes ont été adaptés aux protéines de fusion produites ; par exemple, dans le cas des protéines de granules denses (Dr. L.D. Sibley, communication personnelle), le cocktail leupeptine $1\mu\text{g.ml}^{-1}$, A-PMSF $10\mu\text{g.ml}^{-1}$, E-64 $1\mu\text{g.ml}^{-1}$, TLCK $10\mu\text{g.ml}^{-1}$ s'est révélé le plus adapté.

7. OBTENTION DE SÉRUMS POLYCLONAUX ANTI-GRA2 : IMMUNISATIONS PAR LA PROTÉINE GRA2 NATIVE ET RECOMBINANTE

Afin de produire un sérum de souris monospécifique anti-GRA2, des souris femelles OF1 âgées de 8 à 10 semaines (IFFA CREDO) sont immunisées à 2 semaines d'intervalle, par 4 injections sous-cutanées de $15\mu\text{g}$ d'antigène GRA2 natif, purifié par HPLC, repris dans $100\mu\text{l}$ de PBS-0.15% NP40 et émulsifié avec $100\mu\text{l}$ d'AIF.

Les sérums de souris anti-protéines recombinantes (GRA1 et GRA2) sont produits selon le même protocole expérimental, à l'aide de 4 injections de $20\mu\text{g}$ d'antigène recombinant. Les souris contrôles sont immunisées par $15\mu\text{g}$ de GST native produite dans les mêmes conditions.

8. EXPÉRIENCES DE PROTECTION

Les souris (13 par lot) sont tout d'abord immunisées avec la protéine GRA2 native ou les protéines recombinantes, comme décrit ci-dessus. Sept jours après la dernière immunisation, elles sont infectées par voie orale (Darcy, Torpier et al., 1992), par 1200 kystes de *Toxoplasma gondii*, souche 76K (Laugier and Quilici, 1970). Les souris contrôles sont constituées d'un lot immunisé dans les mêmes conditions, par la GST recombinante et d'un lot ne recevant que l'AIF avant l'infestation.

9. MARQUAGE MÉTABOLIQUE DES AES

Le marquage métabolique des antigènes d'excrétion-sécrétion (AES) de tachyzoïtes est réalisé selon la méthode décrite par Darcy et al. (Darcy, Deslee et al., 1988).

- Marquages métaboliques des AES

1.5×10^8 tachyzoïtes sont incubés à 37°C , pendant 30 min., sous agitation douce, dans 1.5 ml de milieu R.P.M.I déficient en acides aminés utilisés pour le marquage métabolique (Kit R.P.M.I-1640 Select Amine, Gibco BRL) ; ce milieu R.P.M.I est supplémenté avec 10% de sérum de rat décomplémenté et dialysé. Le marquage radioactif est réalisé par incorporation pendant 1 h. de 9.25 MBq de (^3H)isoleucine ($3.44 \text{ TBq mmol}^{-1}$; Amersham, Amersham, Grande Bretagne) ou 9.25 MBq d'un mélange d'acides aminés tritiés à chaque essai (L-(4,5- ^3H)leucine $5.51 \text{ TBq.mmol}^{-1}$; L-(4,5- ^3H)lysine $3.33 \text{ TBq.mmol}^{-1}$; L-(2,3,4,5,6- ^3H)phénylalanine $5.0 \text{ TBq.mmol}^{-1}$; L-(2,3,4,5- ^3H)proline $3.56 \text{ TBq.mmol}^{-1}$; L-(2,3,4,5,6- ^3H)tyrosine $3.85 \text{ TBq.mmol}^{-1}$; Amersham). Une "chasse" (1h. 30 min.) est ensuite réalisée par addition de(s) acides aminés froid(s) correspondant(s) au produit radioactif. Après concentration et dialyse contre du PBS (afin d'éliminer les produits radioactifs non incorporés), les AES sont additionnés de 100 U.ml^{-1} d'aprotinine et conservés à -70°C .

- Immunoprécipitations

Des fractions aliquotes renfermant 40.000 cpm d'AES radiomarqués sont diluées dans 0.5 ml de tampon d'absorption (Tris-HCl 10mM pH8, EDTA 2mM, NaCl 150mM, NP-40 0.5%, Aprotinine 100 U.ml^{-1}) contenant 5 μl de sérum immun ou 5 μl de liquide d'ascite monoclonale. Après 2 h. d'incubation sous agitation à 37°C , les échantillons contenant les immunocomplexes sont transférés dans des tubes contenant 10 mg de protéine A-sépharose (Pharmacia) préalablement équilibrée dans du tampon d'absorption. Les tubes sont alors placés à 4°C , sous agitation pendant une nuit, ceci permettant la fixation des immunocomplexes à la protéine A-Sépharose par la partie constante des chaînes d'immunoglobulines. Les culots de protéine A-Sépharose sont lavés une dizaine de fois en tampon d'absorption, jusqu'à élimination complète de radioactivité dans les surnageants.

Les immunocomplexes sont ensuite élués directement en tampon échantillon protéines, dénaturés 3 min. à 100°C et déposés sur SDS-PAGE 13%. Après migration, les gels sont fixés 30 min. dans une solution d'acide acétique 8%, méthanol 20% et incubés dans une solution amplificatrice (Amplify, Amersham) avant d'être séchés sous vide et autoradiographiés à -70°C (film X-Omat, Kodak, Eastman Kodak Co., Rochester, NY, USA).

III- CARTOGRAPHIE DES EPITOPES B PAR LA TECHNIQUE ELISA

1- sérums humains

Les sérums humains utilisés ont été fournis par le Dr. A. Decoster (Hôpital Saint-Antoine, LILLE). Les sérums chroniques sont définis par la présence d'IgG et l'absence d'IgA et d'IgM (Kits de diagnostic "Platelia IgG, IgA et IgM", Diagnostics Pasteur), les sérums aigus par la présence d'IgA et d'IgM anti P-30 (Decoster, Darcy et al., 1988).

2- Caractérisation de l'épitope B reconnu par l'AcMc TG17-179

Test de compétition

Les plaques sont recouvertes par l'antigène recombinant en tampon Carbonate de Sodium 100 mM pH 9.6 une nuit à 4°C, saturées en PBS pH 7.4-0.1% gélatine (2 h., 20°C). L'AcMc TG17-179 (Charif, Darcy et al., 1990) est ensuite incubé en compétition avec différentes dilutions de peptides dilués en PBS-gélatine. Après 3 h. d'incubation à 37°C et 3 lavages en PBS/Tween 20 0.4%, le conjugué (anti-IgG (H+L) de souris marqué à la peroxydase, Diagnostics Pasteur) est incubé 90 min. à 37°C (dilution 1:10.000). La révélation est effectuée 30 min. à 37°C par l'o-phénylènediamine et l'absorbance est lue à 492 nm.

ELISA direct

Les conditions utilisées sont les mêmes que celles précédemment citées mais les plaques sont recouvertes par 200 µl de peptide à $0.54 \cdot 10^{-5}$ M. L'AcMc TG17-179 (Charif, Darcy et al., 1990) seul est incubé puis révéle par le conjugué.

3- Caractérisation des épitopes B de GRA2 reconnus par les sérums humains

ELISA direct sur le peptide de fusion de 59 a. a.

Les plaques sont recouvertes une nuit à 4°C par 0.04 µg du peptide de fusion de 59 a. a. dilué en tampon phosphate de sodium 0.1M pH 7.2 puis saturées 1 h. à température ambiante en PBS 0.01M pH 7.2/Tween 20 0.05%. Après lavages, les sérums sont incubés 1 h. à 22-24°C (dilution 1:50) en tampon PBS/5% lait écrémé/1% extrait bactérien. Le conjugué, un anti-IgG humaines (H+L) biotinylé (Amersham) est incubé 1 h. à 22-24°C, à la dilution 1:4000 en tampon PBS/5% lait. La réaction est développée 30 min. à 22-24°C à l'aide de complexes streptavidine-biotine marqués à la peroxydase (Amersham) et dilués au 1:4000 en PBS-0.25% gélatine.

Pour chaque test, A₄₉₂ correspond à :

D.O.₄₉₂ du sérum réagissant avec le 59 a. a. - D.O.₄₉₂ du sérum réagissant avec la GST.

Test d'inhibition

Le peptide synthétique correspondant aux 15 a. a. C-terminaux de GRA2 a été utilisé pour inhiber la réactivité des sérums humains (chroniques et aigus) avec le peptide recombinant de 59 a. a.. Les sérums ont été utilisés dans les mêmes conditions que celles décrites ci-dessus. Le peptide synthétique a été ajouté aux dilutions de sérums à une concentration finale de 1 µg/ml ou 10 µg/ml. Le pourcentage d'inhibition correspond à :

D.O.492 en l'absence de peptide - D.O.492 en présence de peptide X100

D.O.492 en absence de peptide

Un peptide irrelevant (peptide 213-230 de SAG1, (Burg, Perelman et al., 1988)) a été utilisé à la concentration finale de 10 µg/ml afin de tester la spécificité de l'inhibition observée.

Immunoblot

Le polypeptide de fusion correspondant aux 212 a. a. a été produit à partir d'un litre de culture du clone bactérien, concentré dans un volume final de 400 µl et déposé sur un min.i-gel de polyacrylamide à 10%. Les sérums (dilution 1:40 en PBS 0.01M pH 7.2 contenant 5% de lait écrémé et 1% d'extrait bactérien) ont été incubés 3 h. à température ambiante avec les bandes de nitrocellulose obtenues après électrotransfert du gel d'acrylamide. Les immunocomplexes formés ont été détectés à l'aide d'un conjugué anti-IgG (H+L) humaines (dilution 1:400 en PBS 0.1 m pH7.2/gélatine 0.25%) puis de complexes streptavidine/biotine marqués à la peroxydase. La coloration a été développée par le 4-chloro-1-naphtol.

4- ELISA IgG GST.GRA1

Les plaques sont recouvertes une nuit à 4°C par 150 ng de polypeptide de fusion GST.GRA1 dilué en tampon carbonate/bicarbonate 0.1M pH9.6 puis saturées 1h. à 37°C en PBS 0.1M pH7.4, lait écrémé 5%. Après lavages, les sérums sont incubés 2h. à 37°C (dilution 1/100) en tampon PBS/Lait 5%/extrait bactérien 1%. Le conjugué anti-IgG (H+L) humaines marqué à la phosphatase alcaline (Biosys) est incubé 1h. à 37°C (dilution 1/10.000) en tampon PBS/lait 5%. La réaction est développée 1h. à 37°C à l'aide d'une solution de para-nitrophénol. Pour chaque test, la valeur de la DO₄₀₅ du sérum réagissant avec la GST est ôtée à la valeur de la DO du sérum réagissant avec le peptide de fusion GST.GRA1.

IV- ETUDE DES PROMOTEURS DE TRANSCRIPTION DES GENES GRA1, GRA2, GRA5 ET GRA6

Les régions initiatrices de transcription sont clonées en amont d'un gène bactérien indicateur (gène codant pour l'enzyme Chloramphénicol Acétyl Transférase ou CAT). Les plasmides contenant ces constructions hybrides sont ensuite introduits par électroporation dans des tachyzoïtes. Après une nuit de culture (temps nécessaire à l'expression de la protéine CAT exogène dans les toxoplasmes), l'activité enzymatique est mise en évidence par chromatographie sur couche mince ou dosée.

1- CONSTRUCTION DE LA SERIE DE PLASMIDES GRA/CAT

L'ADN correspondant aux régions potentiellement promotrices est obtenu par amplification génique (Polymerase Chain Reaction ou PCR) à partir de l'ADN génomique de tachyzoïte ou de l'ADN plasmidique correspondant au clone génomique étudié. Les constructions délétées sont réalisées par digestion enzymatique appropriée des fragments initialement amplifiés.

A) PLASMIDES INITIAUX

Amplification des fragments génomiques par PCR

- Obtention des matrices

Les vecteurs plasmidiques pUC 18 (dans les cas de GRA5 et GRA6, Lecordier, Mercier et al., 1993 ; Lecordier et al., en préparation) ou pUC 19 (dans le cas de GRA2, Mercier, Lecordier et al., 1993) contenant les clones génomiques complets des gènes correspondants sont utilisés comme matrices d'amplification génique. L'ADN plasmidique a été purifié selon la technique "Quiagen" comme cela a été décrit précédemment.

En ce qui concerne le gène GRA1, la PCR a été réalisée directement sur l'ADN génomique de tachyzoïtes tel qu'il est obtenu après lyse des parasites 10 min. à 95°C dans l'eau distillée.

- Obtention des amorces oligonucléotidiques

Les amorces oligonucléotidiques sont choisies de façon à amplifier une région génomique de 300 à 400 pb, en amont du codon ATG d'initiation de la traduction de chaque gène. Des bases additionnelles sont introduites artificiellement aux extrémités de ces amorces, de façon à créer des sites enzymatiques cohésifs aux extrémités des fragments amplifiés et donc à permettre un clonage ultérieur : un site NsiI est ainsi généré en 3' et des sites HindIII et XhoI en 5'. Des

linkers de quelques bases sont également ajoutés derrière chaque site enzymatique de façon à permettre l'accrochage de l'enzyme de restriction choisie.

Les couples d'oligonucléotides (G1.1-G1.2), (G2.1-G2.2), (G5.1-G5.2) et (G6.1-G6.2) (Tableau II) sont synthétisés et purifiés comme cela a déjà été décrit au paragraphe I-3. Ils sont repris dans l'eau distillée et amenés à une concentration de 20 μM .

Réaction de PCR

Les réactions de PCR sont réalisées sur un appareil Perkin Elmer Cetus Thermal Cycler (Perkin Elmer Cetus, Norwalk, CT, USA), dans les conditions standard décrites par le fabricant. 10 ng de matrice plasmidique ou 1 μg d'ADN génomique sont mis en contact avec 0.5 unités de Ampli-Taq Polymérase (Cétus) et 0.5 μmoles de chaque oligonucléotide constituant le couple d'amplification. Après une dénaturation de 7 min. à 94°C, 35 cycles d'amplification sont réalisés (dénaturation 45 sec à 94°C, appariement 1 min. à 55°C, élongation 1 min. à 72°C) avant une élongation terminale de 7min. à 72°C.

La taille des fragments amplifiés est vérifiée par électrophorèse d'une fraction aliquote sur gel d'agarose 2% en tampon 1xTAE. Afin de permettre le sous-clonage ultérieur du fragment d'amplification, la Taq polymérase qui pourrait être restée aux extrémités des fragments amplifiés est éliminée par digestion à la protéinase K 20 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ (Boehringer), 30 min. à 37°C. Après extraction phénolique et précipitation à l'éthanol, les extrémités cohésives nécessaires au clonage sont libérées par les digestions enzymatiques appropriées. L'ADN est ensuite purifié, concentré et dosé sur minigel d'agarose.

Clonage de fragments PCR dans le vecteur SAG1.3'-CAT

Le vecteur SAG1/2-CAT (Soldati and Boothroyd, 1993) nous a été fourni par les Dr J.C. Boothroyd et D. Soldati (Stanford University, CA, USA). Il est dérivé du vecteur commercial pBluescript SK⁺ (Stratagène), par clonage dans son polylinker du gène indicateur CAT, flanqué des séquences 5' et 3' régulatrices de *SAG1*, le gène codant pour l'antigène majeur de surface du Toxoplasme (Burg, Perelman et al., 1988). Il est amplifié dans des *E. coli*, souche JM109 et l'ADN plasmidique est préparé par midi-quiagen. Les 300 bp correspondant à la région 5' non codante du gène *SAG1* sont éliminées du vecteur par NsiI et Hind III (sites uniques du vecteur) de façon à générer un vecteur linéarisé que nous avons baptisé SAG1.3'-CAT.

Les séquences 5' de *GRA1*, *GRA2*, *GRA5* et *GRA6* préalablement amplifiées par PCR sont liguées dans le vecteur SAG1.3'-CAT une nuit à 14°C par la T4 DNA ligase. Les vecteurs recombinants sont introduits dans des *E. coli*, souche JM109, préalablement rendues compétentes pour la transformation, par la méthode au TFB (Sambrook, Fritsch et al., 1989). Les clones obtenus après une nuit de culture sur LB-Ampicilline (100 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$) sont analysés en profil de restriction après une minipréparation de leur ADN par la méthode de lyse alcaline.

B) MUTANTS DE DÉLÉTION

Les mutants de délétion sont dérivés des plasmides précédemment décrits par délétion partielle de l'extrémité 5' des fragments génomiques.

Délétion par enzymes de restriction

Les fragments génomiques initialement amplifiés par PCR ont été digérés dans leur partie 5', en quelques sites de restriction, de façon à déléter 50 puis 100 puis 150 pb. Les extrémités 5' sortantes sont rendues franches par le fragment de Kleenow de l'ADN Polymérase I d'*E.coli*. Les fragments sont digérés en leur extrémité 3' par l'enzyme de restriction NsiI puis clonés dans le vecteur SAG1.3'-CAT ouvert en ses sites HindIII (extrémité 5' sortante remplie par le fragment de Kleenow de L'ADN Polymérase I) et NsiI. Les clones recombinants obtenus sont testés à l'aide d'une minipréparation de leur ADN digéré par les enzymes XhoI et NsiI.

Délétion progressive par l'exonucléase III

~~Cinétique de délétion (Kit "Erase-a-Base", Promega)~~

Les fragments génomiques de *GRA1*, *GRA2* et *GRA5* initialement amplifiés par PCR sont tout d'abord clonés dans les sites HindIII et NsiI du vecteur pGEM7Zf(+) (Promega), de façon à construire les vecteurs pGEM7Zf(+)-*GRA1*, pGEM7Zf(+)-*GRA2* et pGEM7Zf(+)-*GRA5*. Le vecteur pGEM7Zf(+) présente la particularité de contenir un polylinker dont les sites de restriction sont orientés : les sites libérant des extrémités 5' sortantes ou franches (sensibles à l'action de l'exonucléase III) sont regroupés à une des extrémités du polylinker tandis que l'autre extrémité ne contient que des sites de restriction libérant des extrémités 3' sortantes (extrémités résistantes à l'action de l'exonucléase III).

Les plasmides recombinants sont doublement coupés en 5' de leur insert *GRA* par un site SmaI (extrémité franche) proche de l'extrémité 5' de l'insert *GRA* d'une part et d'autre part, et par un site KpnI (extrémité 3' sortante) situé un peu plus en amont. Une cinétique de délétion de l'insert *GRA* initial, à partir de son extrémité 5' peut ensuite être réalisée à 14 ou 20°C, grâce à l'exonucléase III. Les fractions aliquotes sont prélevées toutes les 30 sec. L'action de l'exonucléase III est complétée par celle de la nucléase SI qui dégrade spécifiquement les extrémités monocaténares laissées libres en 5' et 3' du plasmide délété. Les plasmides sont ensuite circularisés par la ligase extraite du phage T4 et amplifiés chez des *E. coli*.

~~Criblage des mutants de délétion~~

La taille des inserts *GRA* issus de la délétion par l'exonucléase III est analysée en profil de restriction, sur gel d'agarose 2,5%-TAE_{x1} (digestion XhoI-NsiI), à partir d'une minipréparation de l'ADN des clones issus de la transformation.

La séquence exacte de chaque insert est vérifiée après préparation de l'ADN monobrin correspondant à chaque mutant. Le vecteur pGEM7Zf(+) contient en effet, tout comme le vecteur pBluescript, une origine f1 de réplication. L'ADN monobrin produit à la suite de la

coinfection des bactéries-hôtes par le phagemide et par le phage helper R408, est préparé selon le protocole déjà décrit puis est utilisé dans une réaction de séquence amorcée par l'oligonucléotide M13-20 (Kit "Multiwell Microtitre Plate DNA Sequencing System", Amersham).

Mutants de délétion par PCR

Certains des mutants de délétion ont été obtenus après amplification par PCR de la région génomique choisie et sous-clonage des fragments amplifiés dans le vecteur SAG1.3'-CAT, comme cela a été décrit au paragraphe IV-1. Les couples d'oligonucléotides utilisés sont (G1.1-G1.3), (G1.1-G1.4), (G2.1-G2.3), (G2.1-G2.4), (G2.1-G2.5), (G5.1-G5.3), (G6.1-G6.4) et (G6.1.6.5) (Tableau II).

2- CONSTRUCTIONS HYBRIDES GRA1-GRA6/CAT ET GRA6-GRA1/CAT

Les couples d'oligonucléotides (G1.1-G1.5) et (G6.1-G6.6) (Tableau II) ont été utilisés dans les conditions de PCR décrites précédemment, de façon à amplifier la région 5' transcrite mais non traduite des gènes *GRA1* et *GRA6* et à introduire artificiellement un site HindIII au niveau du site de démarrage de la transcription de chacun des deux gènes.

Les fragments amplifiés ont été clonés dans le vecteur SAG1.3'-CAT et les plasmides recombinants ont été amplifiés dans des *E. coli*, souche JM109 puis une préparation de leur ADN a été digérée par les sites uniques XhoI et HindIII.

Les produits d'amplification génique obtenus à partir des couples d'oligonucléotides amorces (G1.2'-G1.6) et (G6.2'-G6.7) ont ensuite été digérés par les enzymes XhoI en 5' et HindIII en 3'. Ils ont ensuite été clonés dans les sites XhoI et HindIII des vecteurs recombinants obtenus précédemment, en amont des fragments (G6.1-G6.6) et (G1.1-G1.5) respectivement.

3- TRANSECTION DES TACHYZOITES

Les conditions d'électroporation ont été adaptées d'après le protocole mis au point par les Dr. Soldati et Boothroyd (Soldati and Boothroyd, 1993).

a) Préparation de l'ADN plasmidique

L'ADN plasmidique à transférer est préparé selon la technique classique de lyse alcaline des bactéries, suivie d'une purification des plasmides en gradient discontinu de CsCl (Sambrook, Fritsch et al., 1989).

Juste avant la transfection des tachyzoïtes, l'ADN plasmidique est dialysé contre de l'eau distillée, sur une membrane Millipore (diamètre des pores : 0.022µm) afin d'éliminer toute trace de sels résiduels.

b) Préparation des tachyzoïtes

10^9 tachyzoïtes obtenus après l'infection d'un tapis de cellules Hep-2 sont filtrés au travers de papier filtre (Schleicher et Schuell) afin d'éliminer les cellules non lysées et les déchets cellulaires. Après centrifugation 10 min. à 3.500 r.p.m., le milieu de culture (MEM-PS-10% de SVF décomplémenté, Gibco BRL) est éliminé et les parasites sont lavés dans un grand volume de Cytomix (van den Hoff, Moorman et al., 1992). Le culot obtenu après une nouvelle centrifugation est repris dans du Cytomix supplémenté en agents antioxydants (5 mM GSH, ATP 2 mM pH7.6) de façon à obtenir une concentration de 1.10^7 parasites.ml⁻¹, cette concentration ne tenant compte que des parasites viables (test de viabilité : coloration au Bleu Trypan).

c) Conditions de transfection par électroporation

1.10^7 tachyzoïtes sont mis en contact avec 10 µg d'ADN plasmidique préalablement microdialysé, dans des cuvettes d'électroporation de 4 mm de largeur (Biorad). L'ADN plasmidique est introduit dans les tachyzoïtes par électroporation (2.250 V, 25 µF, 100 Ω, 0.6 ms) à l'aide d'un électroporateur "gene pulser" Biorad. Les parasites sont ensuite remis en culture 20 heures dans des flacons de 15 cm² (Falcon), dans 10 ml de MEM-PS-10% de SVF.

5- CAT ASSAYS

a) Méthode de Gorman (Gorman, Moffat et al., 1982)

20 heures après l'électroporation, l'activité du promoteur présent dans le plasmide transfecté est appréciée par mise en évidence de l'activité CAT, selon la méthode de Gorman (Gorman, Moffat et al., 1982). Si le promoteur est efficace, l'enzyme CAT a été synthétisée par les parasites et sera donc présente dans l'extrait cellulaire. Elle pourra donc acétyler son substrat, le chloramphénicol (marqué au ¹⁴C) en ses formes mono- et di-acétylées. Les produits d'acétylation sont aisément séparables du substrat d'origine, par chromatographie ascendante sur gel de silice. Une exposition autoradiographique permet de visualiser les différentes formes du chloramphénicol.

Les tachyzoïtes transfectés sont centrifugés 10 min. à 3.500 r.p.m. et le culot de parasites est repris par du Tris-HCl 250 mM pH7.8. Ils sont ensuite lysés par trois cycles de congélation (dans l'azote liquide) et décongélation (37°C). L'extrait cellulaire obtenu après élimination des déchets cellulaires par centrifugation de 5 min. à 13.000 r.p.m. est incubé 3 h. à 37°C en présence de 0.075 µCi de [¹⁴C] Chloramphénicol (55 à 60 mCi/mmol) (Amersham), Tris-HCl 250 mM pH7.8 et Acétyl Coenzyme A 560 µg.ml⁻¹ (Sigma). Une quantité égale d'Acétyl coenzyme A est ajoutée après 1 h.30 d'incubation de façon à optimiser la réaction enzymatique. Les produits acétylés du chloramphénicol et le chloramphénicol résiduel sont extraits par l'acétate d'éthyle, concentrés sous vide et déposés au bas d'une couche mince de silice (Merck, Darmstadt, Allemagne). Ils sont ensuite séparés par chromatographie

ascendante, dans une atmosphère saturée en Chloroforme/Méthanol (95/5). La plaque de silice est autoradiographiée contre un film β Max (Amersham) à -70°C .

b) Dosage de l'activité CAT (Seed and Sheen, 1988)

Cette technique permet de quantifier l'activité promotrice d'une séquence d'ADN, celle-ci étant proportionnelle à la quantité de chloramphénicol [^{14}C] acétylé. Les extraits cellulaires sont traités dans les mêmes conditions que celles énoncées ci-dessus puis incubés 2 fois 1 h.30 avec $0.075\ \mu\text{Ci}$ de [^{14}C] Chloramphénicol (55 à 60 mCi/mmol) (Amersham), 250 mM Tris-HCl pH7.8 et $300\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de butyryl coenzyme A (Sigma). Les formes acétylées du chloramphénicol sont ensuite extraites par un volume de xylène (o+p+m, Merck) ; la phase organique est extraite en retour par un volume d'eau afin de diminuer le bruit de fond. Les fractions organiques et aqueuses sont comptées séparément dans 2 ml de liquide de scintillation et le pourcentage de conversion du chloramphénicol est calculé selon :

$$\frac{\text{cpm de la phase organique}}{\text{cpm de la phase organique} + \text{cpm de la phase aqueuse}} \times 100$$

Une moyenne est calculée sur 3 tests réalisés au cours de la même série. Chaque résultat est reproduit au moins 3 fois au cours de 3 expériences différentes.

TABLEAU II**OLIGONUCLEOTIDES ISSUS DE LA SEQUENCE DU GENE *GRA1***

- G1.1:** 5' GGATCGATGCATCTTGCTTGATTTCTTCAAAGAAC 3' (35 b)
G1.2: 5' CTAGCACTCGAGAAGCTTCGAAGGCTGCTAGTACTGGTGATC 3' (42 b)
G1.2': 5' CGCTTCTCGAGTCGAAGGCTGCTAGTACTGGTGAT 3' (35 b)
G1.3: 5' CTAGCACTCGAGAAGCTTCCCGGTCCACCGCTGCG 3' (35 b)
G1.4: 5' CTAGCACTCGAGAAGCTTCGGACCAATTCCCGGTCCAC 3' (38b)
G1.5: 5' CGATGCAAGCTTTGCAATTTTATCGGTTG 3' (29 b)
G1.6: 5' CAGCATGAAGCTTAATGTTGTGGCTTTAC 3' (29 b)

OLIGONUCLEOTIDES ISSUS DE LA SEQUENCE DU GENE *GRA2*

- G2.1:** 5' ACGGATCGATGCATTGTGAGGCGATATGTGGAG 3' (33 b)
G2.2: 5' CACGACTCGAGAAGCTTACGCGTATCACGTCAGTCCTTAC 3' (40 b)
G2.3: 5' CTAGCACTCGAGAAGCTTCGCCAGAGACGAAAATG 3' (36 b)
G2.4: 5' CTAGCACTCGAGAAGCTTCAAATGAACAGCGGAAG 3' (36 b)
G2.5: 5' CTAGCACTCGAGAAGCTTGTCTGTCCTGCGAACTGATC 3' (38 b)

OLIGONUCLEOTIDES ISSUS DE LA SEQUENCE DU GENE *GRA5*

- G5.1:** 5' GGATCGATGCATTTTGTACTTCACGAAAATCGC 3' (34 b)
G5.2: 5' CATGCACTCGAGAAGCTTCGCATGACTCCCTCAG 3' (34 b)
G5.3: 5' CTAGCACTCGAGAAGCTTCGATCCTACCGTCAGTC 3' (35 b)

OLIGONUCLEOTIDES ISSUS DE LA SEQUENCE DU GENE *GRA6*

- G6.1:** 5' ACGGATCGATGCATTTTCGCCGACACTCCCAAG 3' (32 b)
G6.2: 5' CATGCACTCGAGAAGCTTCCGTCACCACAACCTAGCAAC 3' (39 b)
G6.2': 5' CATGCACTCGAGCGTCACCACAACCTAGC 3' (29 b)
G6.4: 5' CTAGCACTCGAGAAGCTTCTGCGACGCGGAGCAGGAAC 3' (38 b)
G6.5: 5' CTAGCACTCGAGAAGCTTGCAAATGCCACTGGCTGAC 3' (38 b)
G6.6: 5' CGTAGCTAAGCTTTGCGTCGTCGAATGC 3' (28 b)
G6.7: 5' GAGCATGAAGCTTATTCTACTAATGGGGAAG 3' (31 b)

ANNEXE : COMPOSITION DES TAMPONS ET MILEUX DE CULTURE

TAMPONS :

PBS : Tampon Phosphate ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.1M - $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0.1M) + NaCl 0.15M

Tampon Carbonate/bicarbonate 0.1M : NaHCO_3 0.1M, Na_2CO_3 0.1M, pH9.6

TE : Tris-HCl 10mM pH8, EDTA 1mM

TAE 10X : Tris-HCl 40mM, $\text{CH}_3\text{COO}^- \text{Na}^+$ 20mM, EDTA 2mM, pH7.9

TBE 10X : Tris-HCl 0.89M, H_3BO_3 0.88M, EDTA 0.02M, pH7.9

SSC 20X : NaCl 3M, $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.3M, pH7.2

SM : Tris-HCl 50mM pH7.5, NaCl 100mM, MgSO_4 10mM, Gélatine 0.1%

Denhardt 50X : BSA 1%, Ficoll 1%, Polyvinylpyrrolidone 1%

MILIEUX DE CULTURE BACTÉRIENS :

LB : Bactotryptone 10g/l, Extrait de Levure 5g/l, NaCl 10g/l, pH7.3

SOB : Bactotryptone 20g/l, Extrait de Levure 5g/l, NaCl 0.58g/l, KCl 0.18g/l, MgCl_2 10mM, MgSO_4 10mM, pH7

2TY : Bactotryptone 16g/l, Extrait de Levure 10g/l, NaCl 5g/l, pH7.4

NZY : NZ Amine 10g/l, Extrait de Levure 5g/l, NaCl 5g/l, MgSO_4 2g/l, pH7.5

Superbroth : Bactotryptone 35g/l, Extrait de Levure 20g/l, NaCl 5g/l, pH7.5

5ÈME PARTIE

BIBLIOGRAPHIE

- Achbarou, A., O. Mercereau-Puijalon, et al.** (1991a).
Characterization of microneme proteins of *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **47**: 223-234.
- Achbarou, A., O. Mercereau-Puijalon, et al.** (1991b).
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**: 285-296.
- Alwine, J. C., D. J. Kemp, et al.** (1979).
Detection of specific RNAs or specific fragments of DNA by fractionation in gels and transfer to diazobenzyloxymethyl-paper. *Meth. Enzymol.* **68**: 220
- Ambroise-Thomas, P. and J. P. Garin** (1984).
Toxoplasmosse. *Encycl. Med. Chir. , Paris, Malad. Infect.* **8098 A10, 4**: 1-8.
- Ambroise-Thomas, P. and H. Pelloux** (1993a).
La toxoplasmosse et sa pathologie. *Med. Mal. Infect.* **23 Special**: 121-128.
- Ambroise-Thomas, P. and H. Pelloux** (1993b).
Toxoplasmosis-Congenital and in immunocompromised patients: a parallel. *Parasitol. Today* **9**: 61-63.
- Anonyme** (1992).
Surveillance du SIDA en France (situation au 30 juin 1992). *BEH* **31**: 145-151.
- Araujo, F. G.** (1991).
Depletion of L3T4⁺ (CD4⁺) T lymphocytes prevents development of resistance to *Toxoplasma gondii* in mice. *Infect. Immun.* **59**: 1614-1619.
- Asai, T. and T. Kim** (1987).
Possible regulation mechanism of potent nucleoside triphosphate hydrolase in *Toxoplasma gondii*. *Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. A* **264**: 464-467.
- Asai, T., F. Mizuno, et al.** (1992).
High correlation in antibody titers between the Sabin-Feldman dye test and an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay detecting Immunoglobulin G antibodies to the nucleoside triphosphate hydrolase of *Toxoplasma gondii*. *J. Clin. Microbiol.* **30**: 1291-1293.
- Asai, T., W. J. O'Sullivan, et al.** (1983).
A potent nucleoside triphosphate hydrolase from the parasitic protozoan *Toxoplasma gondii*. Purification, some properties, and activation by thiol compounds. *J. Biol. Chem.* **258**: 6816-6822.
- Asai, T. and Y. Suzuki** (1990).
Remarkable activities of nucleoside triphosphate hydrolase in the tachyzoites of both virulent and avirulent strains of *Toxoplasma gondii*. *FEMS Microbiol. Lett.* **60**: 89-92.

Auffray, C. and F. Rougeon (1980).

Purification of mouse immunoglobulin heavy-chain 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. *Immunol. Reviews* **127**: 97-117.

Bessières, M. H., S. Le Breton, et al. (1992).

Analysis by immunoblotting of *Toxoplasma gondii* exoantigens and comparison with somatic antigens. *Parasitol. Res.* **78**: 222-228.

Blackwell, J. M., C. W. Roberts, et al. (1993).

Influence of genes within the MHC on mortality and brain cyst development in mice infected with *Toxoplasma gondii*-Kinetics of immune regulation in BALB H2 congenic mice. *Parasite Immunol.* **15**: 317-324.

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.* **21230B18**

Bohne, W., U. Gross, et al. (1993).

Differentiation between mouse-virulent and mouse avirulent strains of *Toxoplasma gondii* by a Monoclonal antibody recognizing a 27-kDa antigen. *J. Clin. Microbiol.* **31**: 1641-1643.

Bohne, W., J. Heesemann, et al. (1993a).

Coexistence of heterogeneous populations of *Toxoplasma gondii* parasites within parasitophorous vacuoles of murine macrophages as revealed by a bradyzoite-specific monoclonal antibody. *Parasitol. Today* **79**: 485-487.

Bohne, W., J. Heesemann, et al. (1993b).

Induction of bradyzoite-specific *Toxoplasma gondii* antigens in IFN-gamma-treated- mouse macrophages. *Infect. Immun.* **61**: 1141-1145.

Bommer, W., H. H. Heunert, et al. (1969).

[Cinematographic studies on the movement of *Toxoplasma gondii*]

Kinematographische Studien über die Eigenbewegung von *Toxoplasma gondii*. *Z. Tropenmed. Parasitol.* **20**: 450-458.

Bommer, W., K. H. Hofling, et al. (1968).

[In vivo observations on the penetration of *Toxoplasma* into the host cell]

Lebendebeobachtungen über das Eindringen von Toxoplasmen in die Wirtszelle. *Dtsch. Med. Wochenschr.* **93**: 2365-2367.

Bonhomme, A., F. Boulanger, et al. (1990).

Toxoplasma gondii: immunochemistry of four antigens with monoclonal antibodies. *Exp. Parasitol.* **71**: 439-451.

Boothroyd, J. C. (1993).

Population biology of *Toxoplasma*-clonality, virulence and speciation (or not). *Infect. Agents and Dis.* **2**: 100-102.

Boothroyd, J. C. and L. D. Sibley (1993).

Population biology of *Toxoplasma gondii*, in "48th forum in immunology". *Res. Immunol.* **144**: 14-16.

Borst, P., J. P. Overdulve, et al. (1984).

DNA circles with cruciforms from *Isospora (Toxoplasma) gondii*. *Biochim. Biophys. Acta* **781**: 100-111.

Brinkmann, V., J. S. Remington, et al. (1993).

Vaccination of mice with the protective F3G3 antigen of *Toxoplasma gondii* activates CD4⁺ but not CD8⁺ T cells and induces *Toxoplasma* specific IgG antibody. *Mol. Immunol.* **30**: 353-358.

Brown, C. R. and R. McLeod (1990).

Class I MHC genes and CD8⁺ T cells determine cyst number in *Toxoplasma gondii* infection. *J. Immunol.* **145**: 3438-3441.

Bülow, 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.

Burn, P. (1988).

Amphitropic proteins: a new class of membrane proteins. *TIBS* **13**: 79-83.

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.

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.

Cazenave, J., F. Forestier, et al. (1992).

Contribution of a new PCR assay to the prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis. *Prenatal Diagnosis* **12**: 119-127.

Cesbron, J. Y., A. Capron, et al. (1985).

Use of a monoclonal antibody in a double-sandwich ELISA for detection of IgM antibodies to *Toxoplasma gondii* major surface protein (P30). *J. Immunol. Methods* **83**: 151-158.

Cesbron-Delauw, M. F. (soumis).

Dense granule organelles of *Toxoplasma gondii*: their role in the host-parasite relationship. *Parasitol. Today*

Cesbron-Delauw, M. F., C. Boutillon, et al. (1992).

Amino acid sequence requirements for the epitope recognized by a monoclonal antibody reacting with the secreted antigen G.P.28.5 of *Toxoplasma gondii*. *Mol. Immunol.* **29**: 1375-1382.

Cesbron-Delauw, M. F. and A. Capron (1993).

Excreted/Secreted antigens of *Toxoplasma gondii* - their origin and their role in the host-parasite interaction, in "48th forum in immunology". *Res. Immunol.* **144**: 41-44.

Cesbron-Delauw, M. F., B. Guy, et al. (1989).

Molecular characterization of a 23-kilodalton major antigen secreted by *Toxoplasma gondii*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**: 7537-7541.

Cesbron-Delauw, M. F., C. Mercier, et al. (1993). Dense granule antigens from *Toxoplasma gondii*. *NATO ASI Series.* **H78**: 33-41.

Cesbron-Delauw, M. F., R. J. Pierce, et al. (1989). A strategy for cloning potential protective antigens of *Toxoplasma gondii*. *Vaccines 89: Modern approaches to new vaccines including prevention of AIDS.* Cold Spring Harbor Laboratory.

Chabasse, D., J. Berthelot, et al. (1983).

A propos de 2 observations de toxoplasmose congénitale. *Bull. Soc. Fr. Parasitol.* **1**: 129-132.

Chang, H. R., G. E. Grau, et al. (1990).

Role of TNF and IL-1 in infections with *Toxoplasma gondii*. *Immunol.* **69**: 33-7.

Chang, H. R. and J. C. Pechere (1989).

Macrophage oxidative metabolism and intracellular *Toxoplasma gondii*. *Microb. Pathog.* **7**: 37-44.

Chang, H. R., J. C. Pechere, et al. (1992).

Role of Tumor Necrosis Factor in chronic murine *Toxoplasma gondii* encephalitis. *Immunol. Infect. Dis.* **2**: 61-68.

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.

Chardès, T. and D. Bout (1993).

Mucosal immune response in toxoplasmosis, in "48th forum in immunology". *Res. Immunol.* **144**: 57-60.

- Chardès, T., F. Velge-Roussel, et al.** (1993).
Mucosal and systemic cellular immune responses induced by *Toxoplasma gondii* antigens in cyst orally infected mice. *Immunol.* **78**: 421-429.
- Charif, H., F. Darcy, et al.** (1990).
Toxoplasma gondii: characterization and localization of antigens secreted from tachyzoites. *Exp. Parasitol.* **71**: 114-124.
- Chiappino, M. L., B. A. Nichols, et al.** (1984).
Scanning electron microscopy of *Toxoplasma gondii*: parasite torsion and host-cell responses during invasion. *J. Protozool.* **31**: 288-292.
- Chobotar, B. and E. Scholtyseck** (1982). *Ultrastructure. The biology of the Coccidia.* Baltimore, University Park Press. 101.
- Chumpitazi, B., T. P. Ambroise, et al.** (1987).
Isolation and characterization of *Toxoplasma* exo-antigens from in vitro culture in MRC5 and Vero cells. *Int. J. Parasitol.* **17**: 829-834.
- Chumpitazi, B., P. Ambroise-Thomas, et al.** (1983).
Exo-antigènes toxoplasmiques produits en cultures in vitro. Détermination de poids moléculaires. *Bull. Soc. Fr. Parasitol.* **1**: 89-92.
- 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.
- Cristina, N., F. Derouin, et al.** (1992).
Polymerase Chain Reaction (PCR) detection of *Toxoplasma gondii* in AIDS patients using the repetitive sequence TGR 1E. *Pathol. Biol.* **40**: 52-55.
- 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.
- Cristina, N., H. Pelloux, et al.** (1993).
Detection of *Toxoplasma gondii* in AIDS patients by PCR. *Infection* **21**: 150-153.
- Crupton, M.J. and J.R. Dedman** (1990)
Protein terminology tangle. *Nature.* **345** : 212.
- Curriel, T. J., E. C. Krug, et al.** (1993).
Cloned human CD4⁺ cytotoxic T-lymphocytes specific for *Toxoplasma gondii* lyse. *J. Immunol.* **151**: 2024-2031.
- Dannemann, B. R., V. A. Morris, et al.** (1989).
Assessment of human natural killer and lymphokine-activated killer cell cytotoxicity against *Toxoplasma gondii* trophozoites and brain cysts. *J. Immunol.* **143**: 2684-2691.

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-dependent 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 *Toxoplasma 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.

Dardé, M. L., B. Bouteille, et al. (1989).

[*Toxoplasma gondii*: ultrastructural study of cystic formations observed in human fibroblast culture]

Toxoplasma gondii: étude ultrastructurale des formations kystiques observées en culture de fibroblastes humains. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* **64**: 403-11.

Dardé, M. L., B. Bouteille, et al. (1988).

Isoenzymic characterization of seven strains of *Toxoplasma 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 membrane enzyme markers during interiorization of tachyzoites of *Toxoplasma gondii* by macrophages. *J. Protozool.* **36**: 164-70.

de Carvalho, L., T. Souto- Padron, et al. (1991).

Localization of lectin-binding sites and sugar-binding proteins in tachyzoites of *Toxoplasma gondii*. *J. Parasitol.* **77**: 156-161.

de Paoli, P., G. Basaglia, et al. (1992).

Lymphocytes bearing gd T-cell receptor in acute toxoplasmosis. *Immunol.* **76**: 668-670.

de Souza, W. and T. Souto-Padron (1978).

Ultrastructural localization of basic proteins on the conoid, rhoptries and micronemes of *Toxoplasma gondii*. Z. Parasitenkd. **56**: 123-129.

Decoster, A., F. Darcy, et al. (1988a).

Recognition of *Toxoplasma gondii* excreted and secreted antigens by human sera from acquired and congenital toxoplasmosis: identification of markers of acute and chronic infection. Clin. Exp. Immunol. **73**: 376-382.

Decoster, A., F. Darcy, et al. (1988b).

IgA antibodies against P30 as markers of congenital and acute toxoplasmosis. Lancet **2**: 1104-1107.

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., R. T. Gazzinelli, et al. (1993).

Emergence of NK1.1⁺ cells as effectors of IFN- γ dependent immunity to *Toxoplasma gondii* in MHC class I-deficient mice. J. Exp. Med. **178**: 1465-1472.

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., F. Chau, et al. (1993).

Bases expérimentales du traitement de la toxoplasmose. Med. Mal. Infect. **23 spécial**: 162-169.

Derouin, F. and Y. J. F. Garin (1993).

Pulmonary toxoplasmosis in immunocompromised patients. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. **12**: 475-476.

Derouin, F., C. Sarfati, et al. (1989).

Laboratory diagnosis of pulmonary toxoplasmosis in patients with acquired immunodeficiency syndrome. J. Clin. Microbiol. **27**: 1661-1663.

Desmonts, G. and J. Couvreur (1974).

Toxoplasmosis in pregnancy and its transmission to the fetus. Bull. N.Y. Acad. Med. **50**: 146-159.

Dimier, I. H. and D. Bout (1993a).

Cooperation of IL1 β and TNF- α in the activation of human umbilical vein endothelial cells to inhibit *Toxoplasma gondii* replication. Immunol. **79**: 336-338.

Dimier, I. H. and D. Bout (1993b).

Rat intestinal epithelial cell line IEC-6 is activated by r-IFN-gamma to inhibit replication of the coccidian *Toxoplasma gondii*. Eur. J. Immunol. **23**: 981-983.

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

- Dubremetz, J. F., A. Achbarou, et al.** (1993). Kinetics and pattern of organelle exocytosis during *Toxoplasma gondii*-host cell interaction. *Parasitol. Res.* **79**: 402-408.
- Dubremetz, J. F. and C. Dissous** (1980). Characteristic proteins of micronemes and dense granules from *Sarcocystis tenella* zoites (*Protozoa, Coccidia*). *Mol. Biochem. Parasitol.* **1**: 279-289.
- Dubremetz, J. F., C. Rodriguez, et al.** (1985). *Toxoplasma 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 J. D. Schwartzman** (1993). Subcellular organelles of *Toxoplasma gondii* and host cell invasion, in "48th forum in immunology". *Res. Immunol.* **144**: 31-33.
- 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 broncho-alvéolaire au cours du SIDA, bilan de deux ans. *Bull. Soc. Fr. Parasitol.* **8**: 243-246.
- Dupouy-Camet, J., M. F. Gavinet, et al.** (1993). Mode de contamination, incidence et prévalence de la toxoplasmose. *Med. Mal. Infect.* **23 special**: 139-147.
- 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.
- Duquesne, V., C. Auriault, et al.** (1991). Identification of T cell epitopes within a 23-kD antigen (P24) of *Toxoplasma gondii*. *Clin. Exp. Immunol.* **84**: 527-534.
- Duret, L., F. Dorkeld et al.** (1993). Strong conservation of non-coding sequences during vertebrates evolution: potential involvement in post-transcriptional regulation of gene expression. *Nucl. Acids Res.* **21**: 2315-2322.
- Dvorak, J. A. and M. S. Crane** (1981). Vertebrate cell cycle modulates infection by protozoan parasites. *Science* **214**: 1034-1036.
- Dynan, W.S. and R. Tjian** (1985). Control of eukaryotic RNA synthesis by sequence-specific DNA binding proteins. *Nature.* **316**: 774-778.
- Edman, P. and G. Begg** (1967). A protein sequenator. *Eur. J. Biochem.* **1**: 80-91.

Ellis, J., H. Griffin, et al. (1993).

Analysis of dinucleotide frequency and codon usage in the phylum *Apicomplexa*. *Gene* **126**: 163-170.

Endo, T., H. Tokuda, et al. (1987).

Effects of extracellular potassium on acid release and motility initiation in *Toxoplasma gondii*. *J. Protozool.* **34**: 291-295.

Endo, T. and K. Yagita (1990).

Effect of extracellular ions on motility and cell entry in *Toxoplasma gondii*. *J. Protozool.* **37**: 133-138.

Entzeroth, R., H. Kerckhoff, et al. (1992).

Microneme secretion in *Coccidia*: confocal laser scanning and electron microscope study of *Sarcocystis muris* in cell culture. *Eur. J. Cell Biol.* **59**: 405-413.

Favaloro, J. M., R. L. Coppel, et al. (1986).

Structure of the RESA gene of *Plasmodium falciparum*. *Nucl. Acid Res.* **14**: 8265-8278.

Ferguson, D. J. and W. M. Hutchison (1987).

An ultrastructural study of the early development and tissue cyst formation of *Toxoplasma gondii* in the brains of mice. *Parasitol. Res.* **73**: 483-491.

Ferguson, D. J., W. M. Hutchison, et al. (1989).

Tissue cyst rupture in mice chronically infected with *Toxoplasma gondii*. An immunocytochemical and ultrastructural study. *Parasitol. Res.* **75**: 599-603.

Fortier, B. and F. Ajana (1992).

La toxoplasmose congénitale : dépistage et traitement. *Méd. Mal. Infect.* **22**: 838-847.

Fortier, B. and J. F. Dubremetz (1993).

Structure et biologie de *Toxoplasma gondii*. *Med. Mal. Infect.* **23 spécial**: 148-153.

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.* **3**: 367-370.

Frenkel, J. K. (1967).

Adoptive immunity to intracellular infection. *J. Immunol.* **98**: 1309-1319.

Frenkel, J. K., J. P. Dubey, et al. (1970).

Toxoplasma gondii in cats: fecal stages identified as coccidian oocysts. *Science* **167**: 893-896.

Freund, Y. R., G. Sgarlato, et al. (1992).

Polymorphisms in the tumor necrosis factor α (TNF- α) gene correlate with murine resistance to development of toxoplasmic encephalitis and with levels of TNF- α mRNA in infected brain tissue. *J. Exp. Med.* **175**: 683-688.

Freyre, A., J. P. Dubey, et al. (1989).

Oocyst-induced *Toxoplasma gondii* infections in cats. *J. Parasitol.* **75**: 750-755.

Furtado, G. C., M. Slowik, et al. (1992).

Laminin enhances binding of *Toxoplasma gondii* tachyzoites to J774 murine macrophage cells. *Infect. Immun.* **60**: 2337-2342.

Gagnon, S., R. C. Levesque, et al. (1993).

Molecular cloning, complete sequence of the small subunit ribosomal RNA coding region and phylogeny of *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **60**: 145-148.

Gallois, Y., F. Foussard, et al. (1988).

Membrane fluidity of *Toxoplasma gondii*: a fluorescence polarization study. *Biol. Cell.* **62**: 11-15.

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. Immunol.* **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.

Gazzinelli, R. T., S. Hieny, et al. (1993).

Interleukin 12 is required for the T lymphocyte independent induction of IFN- γ by an intracellular parasite and induces resistance in T-cell deficient hosts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 6115-6119.

Gazzinelli, R. T., I. P. Oswald, et al. (1992).

IL10 inhibits parasite killing and nitrogen oxide production by IFN- γ -activated macrophages. *J. Immunol.* **148**: 1792-1796.

Gazzinelli, R. T., Y. Xu, et al. (1992).

Simultaneous depletion of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes is required to reactivate chronic infection with *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* **149**: 175-180.

Gerke, V. (1991)

Novel Calcium Binding Proteins-Fundamentals and clinical implications (Heizmann, C.W., ed., Springer-Verlag, 139-155.

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.

Gorman, C. M., L. F. Moffat, et al. (1982).

Recombinant genomes which express chloramphenicol acetyltransferase in mammalian cells. *Mol. Cel. Biol.* **2**: 1044-1051.

Grimwood, J. and J. E. Smith (1992).

Toxoplasma gondii : The role of a 30-kDa surface protein in host cell invasion. *Exp. Parasitol.* **74**: 106-111.

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., D. Dubois, et al. (1993).

Detection of the pathogenic parasite *Toxoplasma gondii* by specific amplification of ribosomal sequences using comultiplex polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* **31**: 203-207.

Guay, J. M., A. Huot, et al. (1992).

Physical and genetic mapping of cloned ribosomal DNA from *Toxoplasma gondii*: primary and secondary structure 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*. *Int. J. Med. Microbiol.* **272**: 526-534.

Hauser, W. J., S. D. Sharma, et al. (1982).

Natural killer cells induced by acute and chronic *Toxoplasma* infection. *Cell. Immunol.* **69**: 330-46.

Hauser, W. J. and V. Tsai (1986).

Acute *Toxoplasma* infection of mice induces spleen NK cells that are cytotoxic for *T. gondii* in vitro. *J. Immunol.* **136**: 313-319.

Henderson, W. R. and E. Y. Chi (1992).

Cytotoxic activity of 13-hydroxyoctadecadienoic acid against *Toxoplasma gondii*. *Parasitol.* **105**: 343-347.

Hérion, P., R. Hernandezpando, et al. (1993).

Subcellular localization of the 54 kDa antigen of *Toxoplasma gondii*. *J. Parasitol.* **79**: 216-222.

Herskowitz, S., S. E. Siegel, et al. (1989).

Spinal cord toxoplasmosis in AIDS. *Neurol.* **39**: 1552-1553.

Hirai, K., K. Hirato, et al. (1966).

A cinematographic study of the penetration of cultured cells by *Toxoplasma gondii*. Jpn. J. V. Res. **14**: 81-90.

Holliman, R. E., J. D. Johnson, et al. (1990).

Diagnosis of cerebral toxoplasmosis in association with AIDS using the Polymerase Chain reaction. Scand. J. Infect. Dis. **22**: 243-244.

Hughes, H. P. and A. H. Balfour (1981).

An investigation of the antigenic structure of *Toxoplasma gondii*. Parasite Immunol. **3**: 235-248.

Hughes, H. P., A. Gonzalez, et al. (1985).

Antigen-specific lymphocyte transformation in congenital toxoplasmosis. Immunol. Lett. **10**: 95-8.

Hughes, H. P., L. H. Kasper, et al. (1988).

Absence of a role for natural killer cells in the control of acute infection by *Toxoplasma gondii* oocysts. Clin. Exp. Immunol. **72**: 394-399.

Hughes, H. P. and F. van Knapen (1982).

Characterization of a secretory antigen from *Toxoplasma gondii* and its role in circulating antigen production. Int. J. Parasitol. **12**: 433-437.

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.

Huldt, G. (1971).

Studies on experimental toxoplasmosis. Ann. N.Y. Acad. Sci. **177**: 146-155.

Hunter, C. A., J. S. Abrams, et al. (1993).

Cytokine messenger RNA in the Central Nervous System of SCID mice infected with *Toxoplasma gondii*- Importance of T-cell-Independent regulation of resistance to *T. gondii*. Infect. Immun. **61**: 4038-4044.

Huskinson, J., B. P. Stepick, et al. (1989).

Toxoplasma antigens recognized by immunoglobulin G subclasses during acute and chronic infection. J. Clin. Microbiol. **27**: 2031-2038.

Huskinson, J., P. Thulliez, et al. (1990).

Toxoplasma antigens recognized by human immunoglobulin A antibodies. J. Clin. Microbiol. **28**: 2632-2636.

Hutchison, W. M., J. F. Dunachie, et al. (1970).

Coccidian-like nature of *Toxoplasma gondii*. Br. Med. J **1**: 142-144.

Huynh, T. V., R. A. Young, et al. (1985). Constructing and screening cDNA libraries in λ gt10 and λ gt11. DNA cloning. IRL Press, Oxford. 49-78.

Iltzsch, M. H. (1993).

Pyrimidine salvage pathways in *Toxoplasma gondii*. *J. Eukaryotic Microbiol.* **40**: 24-28.

Israelski, D. and J. Remington (1990).

Activity of gamma interferon in combination with pyrimethamine or clindamycin in treatment of murine toxoplasmosis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **9**: 358-360.

Jacobs, L. and M. N. Lunde (1957).

A hemagglutination test for toxoplasmosis. *J. Parasitol.* **43**: 308-314.

Janku, J. (1923).

Pathogénèse et anatomie pathologique de la macula dans un oeil de dimension normale et dans un oeil microphthalmalme avec parasitémie de la rétine. *Cas. Lek. Cesk.* **62**: 1021-1027.

Johnson, A. M. (1985).

The antigenic structure of *Toxoplasma gondii*: a review. *Pathol.* **17**: 9-19.

Johnson, A. M. (1990a).

Comparison of dinucleotide frequency and codon usage in *Toxoplasma* and *Plasmodium*: evolutionary implications. *J. Mol. Evol.* **30**: 383-387.

Johnson, A. M. (1990b). *Toxoplasma*: biologie, pathology and immunology. Coccidiosis of man and domestic animals. CRC Press, Boca Raton. Chap 7.

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. Sci.* 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. (1987).

Toxoplasma gondii and *Hammondia hammondi*: DNA comparison using cloned rRNA gene probes. *Exp. Parasitol.* **63**: 272-278.

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. McDonald, et al. (1986).

Characterization and in vitro translation of *Toxoplasma gondii* ribonucleic acid. *Mol. Biochem. Parasitol.* **18**: 313-320.

Johnson, A. M., P. J. McDonald, et al. (1979).

Kinetics of the growth of *Toxoplasma gondii* (RH strain) in mice. *Int. J. Parasitol.* **9**: 55-56.

Johnson, L. L. (1992).

A protective role for endogenous TNF- α in *Toxoplasma gondii* infection. *Infect. Immun.* **60**: 1979-1983.

Joiner, K. A. (1991).

Rhoptry lipids and parasitophorous vacuole formation: a slippery issue. *Parasitol. Today* **7**: 226-227.

Joiner, K. A. (1993).

Cell entry by *Toxoplasma gondii*: all paths do not lead to success, in "48th forum in immunology". *Res. Immunol.* **144**: 34-38.

Joiner, K. A. and J. F. Dubremetz (1993).

Toxoplasma gondii: a protozoan for the nineties. *Infect. Immun.* **61**: 1169-1172.

Joiner, K. A., S. A. Fuhrman, et al. (1990).

Toxoplasma gondii: fusion competence of parasitophorous vacuoles in Fc receptor-transfected fibroblasts. *Science* **249**: 641-646.

Jones, T. C. and J. G. Hirsch (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.

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.

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

Kadonaga, J.T., K.A. Jones et al. (1986)

Promoter-specific activation of RNA polymerase II transcription by Sp1. *TIBS.* **11**: 20-23.

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., 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., K. M. Currie, et al. (1985).

An unexpected response to vaccination with a purified major membrane tachyzoite antigen (P30) of *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* **134**: 3426-3431.

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.

Khan, I. A., M. E. Eckel, et al. (1988).

Production of gamma interferon by cultured human lymphocytes stimulated with a purified membrane protein (P30) from *Toxoplasma gondii*. *J. Infect. Dis.* **157**: 979-984.

Khan, I. A., K. A. Smith, et al. (1988).

Induction of antigen-specific parasitocidal cytotoxic T cell splenocytes by a major membrane protein (P30) of *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* **141**: 3600-3605.

Khan, I. A., K. A. Smith, et al. (1990).

Induction of antigen-specific human cytotoxic T cells by *Toxoplasma gondii*. *J. Clin. Invest.* **85**: 1879-1886.

Khan, I. A., K. A. Smith, et al. (1991).

A purified antigen (P30) mediates CD8⁺ T cell immunity against fatal *Toxoplasma gondii* infection in mice. *J. Immunol.* **147**: 3501-3506.

Kim, K., D. Soldati, et al. (1993).

Gene replacement in *Toxoplasma gondii* with Chloramphenicol Acetyltransferase as selectable marker. *Science* **262**: 911-914.

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. Sci.* **88**: 231-239.

King, C. A. (1988).

Cell motility of sporozoan *Protozoa*. *Parasitol. Today* **4**: 315-318.

Kovacs, J. A., C. J. Allegra, et al. (1990).

Characterization of dihydrofolate reductase of *Pneumocystis carinii* and *Toxoplasma gondii*. *Exp. Parasitol.* **71**: 60-8.

Kozak, M. (1984).

Compilation and analysis of sequences upstream from the translational start site in eukaryotic mRNAs. *Nucl. Acid Res.* **12**: 857-872.

Kozak, M. (1986).

Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell* **44**: 283-292.

Kozak, M. (1989)

Circumstances and mechanisms of inhibition of translation by secondary structure in eukaryotic mRNAs. *Mol. Cell. Biol.* **9**: 5134-5142.

Krahenbuhl, J. L. and J. S. Remington (1982). The immunology of *Toxoplasma* and toxoplasmosis. *Immunology of parasitic infections*. Blackwell Scient. Public. Oxford. 2nd edition, ed. 356-421.

Krug, E. C., J. J. Marr, et al. (1989).

Purine metabolism in *Toxoplasma gondii*. *J. Biol. Chem.* **264**: 10601-7.

Laemmli, U. K. (1970).

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.

Laugier, M. and M. Quilici (1970).

Intérêt expérimental d'une souche de toxoplasmes peu pathogène pour la souris. *Ann. Parasitol. Hum. Comp. (Paris)* **45**: 389-403.

Lecomte, V., B. F. F. Chumpitazi, et al. (1992).

Brain-tissue cysts in rats infected with the RH strain of *Toxoplasma gondii*. *Parasitol. Res.* **78**: 267-269.

Lecordier, L., J. F. Dubremetz, et al. (in preparation).

Characterization of a dense granule antigen of *Toxoplasma gondii* (GRA6) associated to the network of the parasitophorous vacuole.

Lecordier, L., C. Mercier, et al. (1993).

Molecular structure of a *Toxoplasma gondii* dense granule antigen (GRA5) associated with the parasitophorous vacuole membrane. *Mol. Biochem. Parasitol.* **59**: 143-154.

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**: 249-259.

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

Levine, N. D., J. O. Corliss, et al. (1980).

A newly revised classification of the *Protozoa*. *J. Protozool.* **27**: 37-58.

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.

Lindsay, D. S., J. P. Dubey, et al. (1991).

Examination of tissue cyst formation by *Toxoplasma gondii* in cell cultures using bradyzoites, tachyzoites, and sporozoites. *J. Parasitol.* **77**: 126-132.

Lindsay, D. S., R. R. Mitscher, et al. (1993).

Association of host cell mitochondria with developing *Toxoplasma gondii* tissue cysts. *Amer. J. Vet. Res.* **54**: 1663-1667.

Liu, J. L., G. Torpier, et al. (in preparation).

Brefeldin A blocks the secretion of *Toxoplasma gondii*.

Long, P. L. and C. A. Speer (1977). Invasion of host cells by *Coccidia*. *Symposia of the british society for parasitology.* Oxford, 1-26.

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.

Lycke, E., R. Norrby, et al. (1968).

Penetration-enhancing factor extracted from *Toxoplasma gondii* which increases its virulence for mice. *J. Bacteriol.* **96**: 785-788.

Makioka, A. and A. Kobayashi (1991).

Toxoplasmacidal activity of macrophages activated by recombinant major surface antigen (P30) of *Toxoplasma gondii*. *Infect. Immun.* **59**: 2851-2852.

Makioka, A., B. Stavros, et al. (1993).

Detection and characterization of DNA polymerase activity in *Toxoplasma gondii*. *Parasitol.* **107**: 135-139.

Manafi, M., A. Hassl, et al. (1993).

Enzymatic profile of *Toxoplasma gondii*. *Applied. Microbiol.* **16**: 66-68.

Matsuura, T., T. Tegoshi, et al. (1992).

Epitope-selected monospecific antibodies to recombinant antigens from *Toxoplasma gondii* reacted with dense granules of tachyzoites. *J. Histochem. Cytochem.* **40**: 1725-1730.

Mauras, G., M. Dodeur, et al. (1980).

Partial resolution of the sugar content of *Toxoplasma gondii* membrane. *Biochem. Biophys. Res. Communic.* **97**: 906-912.

McLeod, R., C. Brown, et al. (1993).

Immunogenetics influence outcome of *Toxoplasma gondii* infection, in "48th forum in immunology". *Res. Immunol.* **144**: 61-65.

McLeod, R., D. Mack, et al. (1991).

Toxoplasma gondii-new advances in cellular and molecular biology. *Exp. Parasitol.* **72**: 109-121.

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.* **58**: 71-82.

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.

Morlat, P., J. M. Ragnaud, et al. (1993).

La toxoplasmose cérébrale au cours du SIDA. *Med. Mal. Infect.* **23 spécial**: 183-89.

Murray, A., C. Mercier, et al. (1993).

Multiple B-cell epitopes in a recombinant GRA2 secreted antigen of *Toxoplasma gondii*. *Appl. Parasitol.* **34**: 235-244.

Murray, H. W., B. Y. Rubin, et al. (1985).

Human mononuclear phagocyte antiprotozoal mechanisms: oxygen-dependent vs oxygen-independent activity against intracellular *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* **134**: 1982-1988.

Nagasawa, H., M. Oka, et al. (1992).

Induction of heat shock protein closely correlates with protection against *Toxoplasma gondii* infection. Proc.Natl.Acad.Sci. (USA) **89**: 3155-3158.

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.

Odenthal-Schnittler, M., S. Tomavo, et al. (1993).

Evidence for N-linked glycosylation in *Toxoplasma gondii*. Biochem. J. **291**: 713-721.

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 lymphocyte subpopulation involved in the protective immune response to *Toxoplasma gondii* in mice. Clin. Exp. Immunol. **84**: 207-212.

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.

Partanen, P., H. J. Turunen, et al. (1984).

Immunoblot analysis of *Toxoplasma* antigens by human immunoglobulins G, M and A antibodies at different stages of infection. J. Clin. Microbiol. **20**: 133-135.

Pavesio, C. E. N., M. L. Chiappino, et al. (1992).

Toxoplasma gondii : differentiation and death of bradyzoites. Parasitol. Res. **78**: 1-9.

Pelloux, H., S. Picot, et al. (1993).

Biologie moléculaire : hybridation et amplification des gènes en parasitologie. Rev. Franç. Lab. **253**: 75-80.

Peng, Z.-Y. and T. E. Mansour (1992).

Purification and properties of a pyrophosphate-dependant phosphofructokinase from *Toxoplasma gondii*. Mol. Biochem. Parasitol. **54**: 223-230.

Perkins, M. E. (1992).

Rhoptry organelles of apicomplexan parasites. Parasitol. Today **8**: 28-32.

Peterson, G. L. (1977).

A simplification of the protein assay method Lowry et al. which is more generally applicable. Anal. Biochem. **83**: 346-356.

Pfefferkorn, E. R. (1984).

Interferon gamma blocks the growth of *Toxoplasma gondii* in human fibroblasts by inducing the host cells to degrade tryptophan. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **81**: 908-912.

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

Pfefferkorn, E. R. (1990). Cell biology of *Toxoplasma gondii*. Modern parasite biology: cellular, immunological and molecular aspects. Freeman. New York. 26-50.

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. and L. C. Pfefferkorn (1977).

Toxoplasma gondii: specific labeling of nucleic acids of intracellular parasites in Lesch-Nyhan cells. Exp. Parasitol. **41**: 95-104.

Pfefferkorn, L. C. and E. R. Pfefferkorn (1980).

Toxoplasma gondii: genetic recombination between drug resistant mutants. Exp. Parasitol. **50**: 305-316.

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., G. A. Filice, et al. (1992).

Cytomegalovirus-induced reactivation of *Toxoplasma gondii* pneumonia in mice: lung lymphocyte phenotypes and suppressor function. *J. Infect. Dis.* **166**: 677-681.

Porchet, E. and G. Torpier (1977).

[Freeze fracture study of *Toxoplasma* and *Sarcocystis* infective stages]

Etude du germe infectieux de *Sarcocystis tenella* et *Toxoplasma gondii* par la technique du cryodecapage. *Z. Parasitenkd.* **54**: 101-124.

Prince, J. B., F. G. Araujo, et al. (1989).

Cloning of cDNAs encoding a 28 kilodalton antigen of *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **34**: 3-13.

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.

Prince, J. B., Q. M. Koven, et al. (1985).

Cell free synthesis of *Toxoplasma gondii* antigens. *Mol. Biochem. Parasitol.* **17**: 163-170.

Ridel, P. R., C. Auriault, et al. (1988).

Protective role of IgE in immunocompromised rat toxoplasmosis. *J. Immunol.* **141**: 978-983.

Rodriguez, C., D. Afchain, et al. (1985).

Major surface protein of *Toxoplasma gondii* (p30) contains an immunodominant region with repetitive epitopes. *Eur. J. Immunol.* **15**: 747-749.

Rogers, S., R. Wells, et al. (1986).

Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science* **234**: 304-368.

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. Sieroter Milan* **65**: 193-203.

Roos, D. S. (1993).

Primary structure of the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene from *Toxoplasma gondii*. *J. Biol. Chem.* **268**: 6269-6280.

Roques, C., M. H. Bessières, et al. (1986).

Caractérisation des protéines des exo-antigènes provenant de différentes souches de *Toxoplasma gondii*. *Bull. Soc. Fr. Parasitol.* **4**: 79-84.

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.

Saavedra, R. and P. Herion (1991).

Human T-cell clones against *Toxoplasma gondii*: production of interferon γ , interleukin-2, and strain cross-reactivity. *Parasitol. Res.* **77**: 379-385.

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., S. Frontier, et al. (1986).

Influence du nombre de parasites inoculés sur l'infestation in vitro de cellules Hela par la coccidie *Besnoitia jellisoni* Frenkel. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* **61**: 265-272.

Sadak, A., Z. Taghy, et al. (1988).

Characterization of a family of rhoptry proteins of *Toxoplasma gondii*. *Mol Biochem Parasitol* **29**: 203-211.

Saffer, L. D., K. S. Long, 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 after 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.

Sambrook, J., E. F. Fritsch, et al. (1989). *Molecular cloning. A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Sanger, F., S. Nicklen, et al. (1977).

DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5463-5467.

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. (1989).

Isolation of a potential DNA probe for *Toxoplasma gondii*. *Microbios* **58**: 165-172.

Savva, D., J. C. Morris, et al. (1990).

Polymerase chain reaction for 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. 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 (1982).

Toxoplasma gondii: purine synthesis and salvage in mutant host cells and parasites. *Exp. Parasitol.* **53**: 77-86.

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.

Schwarz, R. T. and S. Tomavo (1993).

The current status of the glycobiology of *Toxoplasma gondii*: glycosylphosphatidylinositols, N- and O-linked glycans, in "48th forum in immunology". *Res. Immunol.* **144**: 24-31.

Seed, B. and J.-Y. Sheen (1988).

A simple phase-extraction assay for chloramphenicol acyltransferase activity. *Gene* **67**: 271-277.

Seguela, J. P. (1982).

Cinétique des anticorps IgA, IgG, IgM dans la toxoplasmose. *Lyon Med.* **248**: 21-23.

Sethi, K. K., T. Endo, et al. (1981).

Toxoplasma gondii trophozoites precoated with specific monoclonal antibodies cannot survive within normal murine macrophages. *Immunol. Letters* **2**: 343-346.

Sethi, K. K., A. Rahman, et al. (1977).

Search for the presence of lectin-binding sites on *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. M. Hofflin, et al. (1985).

In vivo recombinant interleukin 2 administration enhances survival against a lethal challenge with *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* **135**: 4160-4163.

Sharma, S. D., J. Mullenax, et al. (1983).

Western Blot analysis of the antigens of *Toxoplasma gondii* recognized by human IgM and IgG antibodies. *J. Immunol.* **131**: 977-983.

Shaw, G. and R. Kamen (1986)

A conserved AU sequence from the 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation. *Cell.* **46**: 659-667.

Sheffield, H. G. and M. L. Melton (1970).

Toxoplasma gondii: the oocyst, sporozoite, and infection of cultured cells. *Science* **167**: 892-893.

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. *Immunol. Rev.* **127**: 183-204.

Sibley, L. D. (1993).

Interactions between *Toxoplasma gondii* and its mammalian host cells. *Semin. Cell Biol.* **4**: 335-344.

Sibley, L. D., L. B. Adams, et al. (1991).

Tumor necrosis factor- α triggers antitoxoplasmal activity of IFN- γ 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 (1992a). Calcium-regulated secretion and modification of host cell endocytic compartments by *Toxoplasma*. *Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology*, Keystone, USA, *J. Cell. Biochem.* **16A**: 148.

Sibley, L. D. and J. C. Boothroyd (1992b).

Construction of a molecular karyotype for *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **51**: 291-300.

Sibley, L. D. and J. C. Boothroyd (1992c).

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., J. L. Krahenbuhl, et al. (1986).

Toxoplasma modifies macrophage phagosomes by secretion of a vesicular network rich in surface proteins. *J. Cell. Biol.* **103**: 867-874.

Sibley, L. D., R. Lawson, et al. (1986).

Superoxide dismutase and catalase in *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **19**: 83-87.

Sibley, L. D., M. Messina, et al. (in preparation).

Stable DNA transformation in the obligate intracellular parasite *Toxoplasma gondii* by complementation of tryptophan auxotrophy.

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., E. R. Pfefferkorn, et al. (1993).

Parasite genomes - Development of genetic systems for *Toxoplasma gondii*. *Parasitol. Today* **9**: 392-395.

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.

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.

Soete, M., B. Fortier, et al. (1993).

Toxoplasma gondii: kinetics of bradyzoite-tachyzoite interconversion in vitro. *Exp. Parasitol.* **76**: 259-264.

Soldati, D. and J. C. Boothroyd (1993).

Transient transfection and expression in the obligate intracellular parasite *Toxoplasma gondii*. *Science* **260**: 349-352.

Southern, E. M. (1975).

Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**: 503-517.

Splendore, A. (1908).

Un nuovo protozoo parassita de' conigli in contratto nelle lesioni in molti punti il kal-azar dell'uno. Nota preliminari pel. *Rev. Soc. Sci. (Sao Paulo)* **3**: 109-112.

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.

Subauste, C. S., L. Dawson, et al. (1992).

Human lymphokine-activated killer cells are cytotoxic against cells infected with *Toxoplasma gondii*. *J. Exp. Med.* **176**: 1511-1519.

Subauste, C. S., A. H. Koniaris, et al. (1991).

Murine CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes lyse *Toxoplasma gondii*-infected cells. *J. Immunol.* **147**: 3955-3959.

Subauste, C. S. and J. S. Remington (1993).

Immunity to *Toxoplasma gondii*. *Cur. Opin. Immunol.* **5**: 532-537.

Suzuki, Y., F. K. Conley, et al. (1990).

Treatment of toxoplasmic encephalitis in mice with recombinant gamma interferon. *Infect. Immun.* **58**: 3050-3055.

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. Orellana, et al. (1988).

Interferon-gamma: the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. *Science* **240**: 516-518.

Suzuki, Y. and J. S. Remington (1990).

The effect of anti-IFN-gamma antibody on the protective effect of Lyt-2⁺ immune T cells against toxoplasmosis in mice. *J. Immunol.* **144**: 1954-1956.

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.

Taraschi, T.F. and B. Pouvelle (1992)

A parasitophorous duct in *Plasmodium* infected red blood cells. Reply. *Parasitol. Today.* **8** : 17

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.

Thardin, J. F., C. M'Rini, et al. (1993).

Eicosanoid production by mouse peritoneal macrophages during *Toxoplasma gondii* penetration: role of parasite and host cell phospholipases. *Infect. Immun.* **61**: 1432-1441.

Tibayrenc, M. (1993).

Entamoeba, *Giardia* and *Toxoplasma*-clones and cryptic species. *Parasitol. Today* **9**: 102-105.

Tomavo, S., J. F. Dubremetz, et al. (1992a).

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. (1992b).

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., A. Martinage, et al. (1992).

Phosphorylation of *Toxoplasma gondii* major surface antigens. *Parasitol. Res.* **78**: 541-544.

Tomavo, S., R. T. Schwarz, et al. (1989).

Evidence for glycosyl-phosphatidylinositol 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.* **77**: 13-22.

Towbin, H., T. Staehelin, et al. (1979).

Electrophoretic transfer of proteins from acrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 4350-4354.

van den Hoff, M. J. B., A. F. M. Moorman, et al. (1992).

Electroporation in "intracellular" buffer increases cell survival. *Nucl. Acids Res.* **20**: 2902.

van Gelder, P., F. Bosman, et al. (1993).

Serodiagnosis of toxoplasmosis by using a recombinant form of the 54-kilodalton rhostry antigen expressed in *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* **31**: 9-15.

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 evolution lors de l'elaboration 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. Acids Res.* **14**: 4683-4690.

Ware, P. L. and L. H. Kasper (1987).

Strain-specific antigens of *Toxoplasma gondii*. *Infect. Immun.* **55**: 778-783.

Watanabe, H., Y. Suzuki, et al. (1993).

Toxoplasma gondii: induction of toxoplasmic encephalitis in mice with chronic infection by inoculation of a murine leukemia virus inducing immunodeficiency. *Exp. Parasitol.* **76**: 39-45.

Werk, R. (1985).

How does *Toxoplasma gondii* enter host cells? *Rev. Infect. Dis.* **7**: 449-457.

Werk, R. and W. Bommer (1980).

Toxoplasma gondii: membrane properties of active energy-dependent invasion of host cells. *Tropenmed. Parasitol.* **31**: 417-420.

Werk, R., R. Dunker, et al. (1984).

Polycationic polypeptides: a possible model for the penetration-enhancing factor in the invasion of host cells by *Toxoplasma gondii*. *J. Gen. Microbiol.* **130**: 927-933.

Werk, R. and S. Fischer (1982).

Attempts to infect plant protoplasts with *Toxoplasma gondii*. *J. Gen. Microbiol.* 211-213.

Williams, D. M., F. C. Grumet, et al. (1978).

Genetic control of murine resistance to *Toxoplasma gondii*. *Infect. Immun.* **19**: 416-420.

Wong, S. Y., M. P. Hajd, et al. (1993).

Role of specific IgE in diagnosis of acute *Toxoplasma* infection and toxoplasmosis. *J. Clin. Microbiol.* **31**: 2952-2959.

Xiong, C., R. B. Grieve, et al. (1993).

Expression of *Toxoplasma gondii* P30 as fusions with glutathione S-transferase in animal cells by Sindbis recombinant virus. *Mol. Biochem. Parasitol.* **61**: 143-148.

Yasuda, T., K. Yagita, et al. (1988).

Immunocytochemical localization of actin in *Toxoplasma gondii*. Parasitol. Res. **75**: 107-113.

Yong, E. C., E. Y. Chi, et al. (1991).

Human platelet-mediated cytotoxicity against *Toxoplasma gondii*: role of thromboxane. J. Exp. Med. **173**: 65-78.

Zenner, L., F. Darcy, et al. (1993).

Rat model of congenital toxoplasmosis-rate of transmission of three *T. gondii* strains to fetuses and protective effects of a chronic infection. Infect. Immun. **61**: 360-363.

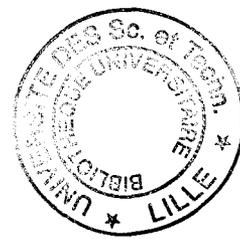
Zgrzebski, G., W. Raether, et al. (1993)

Secretion of an *Eimeria tenella* sporozoite antigen during host-cell invasion: visualization of the parasitophorous vacuole membrane and parasitophorous duct-like structures. Parasitol. Res. **79**: 77-79

SOMMAIRE

	page
<u>RESUME</u>	12
<hr/>	
<u>1ère Partie : Généralités</u>	14
<u>INTRODUCTION</u>	15
<u>GENERALITES</u>	17
Cycle parasitaire	17
Figure 1	18
I- LA TOXOPLASMOSE	19
1- La maladie	19
2- Le diagnostic	20
3- Prévention et traitements	22
II- IMMUNITE ANTI-TOXOPLASMIQUE	23
1- Immunité humorale	23
2- Immunité cellulaire	24
3- Influence du patrimoine génétique de l'hôte	27
III- STRUCTURE ET BIOLOGIE DU TOXOPLASME	28
1- Le tachyzoïte	28
Figure 2	29
Figure 3	30

2- Invasion de la cellule-hôte et multiplication du tachyzoïte	32
- <i>contact avec la cellule-hôte</i>	32
- <i>Invasion de la cellule-hôte</i>	32
- <i>Modification de la vacuole parasitophore</i>	33
- <i>Multiplication des tachyzoïtes</i>	34
- <i>Sortie de la cellule-hôte</i>	34
Cas particulier ces cellules phagocytaires	34
Figure 4	35
3- Kystes et bradyzoïtes	36
- <i>Kystes</i>	36
Figure 5	37
- <i>Bradyzoïtes</i>	38
- <i>Conversion tachyzoïtes-bradyzoïtes</i>	38
4- Biochimie du Toxoplasme	38
IV- GENETIQUE DU TOXOPLASME	40
1- Caryotype et ADN	40
2- Nomenclature des gènes clonés	41
Tableau I	42
2- ARN	43
3- Polymorphisme génétique	44
V- STRUCTURE MOLECULAIRE DU TOXOPLASME	45
1- Molécules de surface	45
- <i>Caractéristiques communes</i>	45
- <i>L'antigène majeur de surface P30 ou SAG1</i>	46
- <i>Mutants déficients en protéines de surface</i>	47
2- Molécules de rhoptries	47
- <i>Rôle des protéines de rhoptries dans l'invasion cellulaire</i>	47
- <i>Caractérisation moléculaire des protéines de rhoptries</i>	48



3- Molécules de micronèmes	49
4- Molécules de granules denses	49
- Antigènes d'Excrétion-Sécrétion (AES)	49
- Molécules de granules denses	50
Figure 6	52
Figure 7	53
<u>BUT DU TRAVAIL</u>	55

2ème partie : Résultats 56

I- CARACTERISATION MOLECULAIRE DE L'ANTIGENE GRA2 57

<i>Isolement des clones d'ADNc.</i>	58
<i>Homologie avec la séquence du gène codant pour l'antigène P28</i>	58
<i>Caractérisation du gène GRA2</i>	59
<i>Divergence entre P28 et GRA2</i>	59
<i>Caractéristiques de la séquence primaire de GRA2</i>	60
<i>Quelques hypothèses sur la fonction de GRA2</i>	60

Molecular and Biochemical Parasitology (1993) 58: 71-82 62

II- ETUDE DE L'IMMUNOGENICITE ET DE L'ANTIGENICITE DES POLYPEPTIDES GRA1 ET GRA2 RECOMBINANTS 74

A/ CARACTÉRISATION DE L'ÉPITOPE RECONNU PAR L'ACMC TG17-179	74
B/ PRODUCTION DES MOLECULES RECOMBINANTES CHEZ <i>E. COLI</i>	75
Figure 8	76

C/ IMMUNOGENICITE ET ANTIGENICITE DES POLYPEPTIDES RECOMBINANTS	77
1°/ Obtention de sondes anticorps monospécifiques	77
Figure 9	78
2°/ Cartographie des épitopes B de l'antigène GRA2 reconnus par les sérums humains d'infection	79
3°/ Mise au point d'un système ELISA-IgG utilisant l'antigène recombinant GST-GRA1	80
Figure 10	81
Molecular Immunology (1992) 29 : 1375-1382	82
Applied Parasitology (1993), 34 : 235-244	90
<u>III- IDENTIFICATION DU PROMOTEUR DE TRANSCRIPTION DES GENES GRA1, GRA2, GRA5 ET GRA6</u>	100
Article en préparation (Mol. Cell. Biol.)	102
<hr/>	
<u>3ème partie : Conclusion</u>	131
<hr/>	
<u>4ème partie : Matériel et Méthodes</u>	141
<u>I-CLONAGE DU GENE CODANT POUR L'ANTIGENE GRA2</u>	142
<u>1. BANQUE D'ADNc</u>	142
a) Purification de l'ARN total de tachyzoïtes	142
b) Construction de la banque d'ADNc	142
c) Criblage par expression à l'aide de l'AcMc TG17-179	143
d) Excision des clones sous forme de phagemide pBluescript	143
e) Production des monobrans pBluescript	143
f) Séquençage	144

<u>2. BANQUE GÉNOMIQUE</u>	144
a) Purification de l'ADN génomique de tachyzoïtes	144
b) Construction de la banque génomique	144
c) Criblage par hybridation moléculaire à l'aide d'une sonde radiomarquée d'ADNc	144
d) Sous-clonage en vecteur plasmidique pUC	145
e) Sous-clonage en vecteur phagique M13	146
f) Séquençage	146
<u>3. ETUDES COMPLEMENTAIRES</u>	146
a) Southern Blot	147
b) Protection à la nucléase S1	147
c) Northern Blot	148
d) Extension d'amorce	148
<u>II- PRODUCTION ET PURIFICATION DES PROTEINES PARASITAIRES ET RECOMBINANTES</u>	149
1. Obtention des parasites	149
2. Western blots d'extrait total de tachyzoïtes et de protéines recombinantes	150
a) Obtention d'extraits de protéines de tachyzoïtes	150
b) Obtention de protéines recombinantes	150
c) Analyse immunochimique des extraits protéiques	151
3. Purification de la protéine native GRA2 par HPLC en phase inverse	151
4. Digestion par la trypsine et séquençage des peptides générés	152
a) Séquençage de la protéine native purifiée par HPLC	152
b) Séquençage des peptides dérivés de la digestion tryptique de la protéine native	152
5. Analyse de la séquence primaire de la protéine	153
6. Expression de protéines recombinantes chez <i>E. coli</i> dans le système pGEX	153
a) Sous-Clonage dans le vecteur pGEX	153
b) Criblage des recombinants	154
c) Production et purification des protéines recombinantes	155

7. Obtention de sérums polyclonaux anti-GRA2 : Immunisations par la protéine GRA2 native et recombinante	156
8. Expériences de protection	156
9. Marquage métabolique des AES	156
<u>III- CARTOGRAPHIE DES EPITOPES B PAR LA TECHNIQUE ELISA</u>	158
1- sérums humains	158
2- Caractérisation de l'épitope B reconnu par l'AcMc TG17-179	158
3- Caractérisation des épitopes B de GRA2 reconnus par les sérums humains	158
4- ELISA IgG GST.GRA1	159
<u>IV. ETUDE DES PROMOTEURS DE TRANSCRIPTION DES GENES <i>GRA1</i>, <i>GRA2</i>, <i>GRA5</i> ET <i>GRA6</i></u>	160
1- CONSTRUCTION DE LA SERIE DE PLASMIDES GRA/CAT	160
A) PLASMIDES INITIAUX	160
B) MUTANTS DE DÉLÉTION	162
2- CONSTRUCTIONS HYBRIDES GRA1-GRA6/CAT ET GRA6-GRA1/CAT	163
3- TRANSFECTION DES TACHYZOITES	163
a) Préparation de l'ADN plasmidique	163
b) Préparation des tachyzoïtes	164
c) Conditions de transfection par électroporation	164
4- CAT ASSAYS	164
a) Méthode de Gorman	164
b) Dosage de l'activité CAT	165
Tableau II : Oligonucléotides utilisés pour les réactions de PCR	166
Annexe : Composition des tampons et milieux de culture bactériens	167

