50376
1995
129

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES

LILLE - FLANDRES - ARTOIS

THESE

présentée par

Martine SOETE

pour l'obtention du

DOCTORAT DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

ETUDE EXPERIMENTALE DE L'INTERCONVERSION TACHYZOITE - BRADYZOITE CHEZ *TOXOPLASMA GONDII*

Date prévue de la soutenance: 29 Mai 1995

JURY
Daniel CAMUS
Xavier DESBIENS
Jean - François DUBREMETZ
Geneviève MILON
Gérard PRENSIER
Dominique SOLDATI

UNITE DE BIOLOGIE ET DE BIOCHIMIE PARASITAIRES ET FONGIQUES
INSERM Unité 42, VILLENEUVE D'ASCQ

SCD LILLE 1
D 030 299305 8

gm 2-103997

AVANT - PROPOS

UNIVERSITÉ DES SC. ET TECHN. BIBLIOTHÈQUE UNIVERSITAIRE LILLE

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à:

Monsieur le Docteur X. Desbiens,
Madame le Docteur G. Milon (rapporteur),
Monsieur le Docteur G. Prensier (rapporteur),
Madame le Docteur D. Soldati,

pour avoir accepté de faire partie du Jury et de juger ce travail.

Je tiens à exprimer ma sincère gratitude au *Professeur D. Camus* pour m'avoir acceuillie dans son unité et pour son soutien scientifique, à *Madame le Docteur C. Odberg - Ferragut* pour ses conseils et pour m'avoir initiée au monde de la biologie moléculaire.

Je tiens à remercier chaleureusement *Anne Loyens, Isabelle Briche, Anne Engels, et Marlène Mortuaire,* pour leur participation technique à ce travail et pour la sympathie qu'elles m'ont témoignée.

Je tiens à remercier de tout coeur l'équipe de l'Unité 42, les jeunes et les moins jeunes, pour leur amitié et leur soutien qu'ils m'ont apportés au cours de ce travail.

Un merci particulier à *Valérie* et à *Myriam*, mes deux complices tout au long de ces années passées au laboratoire.

Je tiens à remercier particulièrement le **Docteur J.F. Dubremetz** pour m'avoir fait découvrir le monde passionnant de la recherche, pour m'avoir fait partagé ses connaissances, pour son aide, et pour ses discussions scientifiques toujours enrichissantes.

De vifs et de sincères remerciements pour tout et tous!

SOMMAIRE

GENERALITES p 6

I. Historique p 7

II. Cycle biologique p 8

III. La toxoplasmose p10

III.1. La toxoplasmose congénitale p10
III.2. La toxoplasmose de l'immunodéprimé p10

IV. le Toxoplasme p13

IV.1. La structure du zoïte p13
IV.2. L'invasion de la cellule hôte p15
IV.3. L'enkystement p16
IV.4. La structure moléculaire p18
* Les molécules membranaires p18
* Les protéines du complexe apicale p18
* Les antigènes spécifiques de stade p20

V. La réponse immune à l'infection par *T. gondii* p21

V.1. L'immunité à médiation humorale p21
V.2. L'immunité à médiation cellulaire p22
* 2.1. Contrôle de l'infection aigue p23
* 2.2. Contrôle de la toxoplasmose cérébrale p25

VI. la différenciation parasitaire p28

MATERIELS ET METHODES p32

I. Matériels p33

I.1. la culture cellulaire p33

I.2. Les parasites p33
* 2.1. Les souches p33
* 2.2. L'entretien p33
* 2.3. La purification des parasites intracellulaires p34
* 2.4. La production d'oocystes p34

I.3. Les anticorps monoclonaux p35
* 3.1. Les spécificités antigéniques p35
* 3.2. Purification et biotinylation de l'anti SAG1 p35

II. Méthodes p37

II.1. Immunofluorescence indirecte p37

II.2. Microscopie électronique p37
* 2.1. Etude ultrastructurale p37
* 2.2. Immunolocalisation p38

II.3. Marquages métaboliques p39

II.4. Biotinylation des molécules de surface p39

II.5. Techniques immunochimiques p39
* 5.1. Préparation de l'immunoadsorbant T8 3B1 p39
* 5.2. Immunoprécipitation de la protéine P18 par immunoaffinité p40

II.6. Techniques électrophorétiques p41
* 6.1. Electrophorèse en gel d'acrylamide SDS - Page p41
* 6.2. Détection des protéines par coloration au nitrate d'argent p41
* 6.3. Autoradiographie p42
* 6.4. Electrotransfert et immunoempreinte (Western Blot) p42

II.7. microséquençage de la P18 p43
* 7.1. Séquençage N terminale p43
* 7.2. Analyse de la composition en acides aminés et séquençage interne p44

III. Amplification et clonage d'un fragment du gène codant pour la protéine P18 p45

III.1. Préparation de l'ADN génomique de *Toxoplasma gondii* p45

III.2. Réaction d'amplification en chaine (PCR) p45
* 2.1. Préparation des amorces de PCR p45
* 2.2. Réaction d'amplification p46
* 2.3. Analyse du fragment amplifié p46

III.3. Clonage du fragment amplifié p46

* 3.1. Préparation du fragment p46
* 3.2. Insertion dans un vecteur plasmidique p47
* 3.3. Transformation des bactéries compétentes p47
* 3.4. Recherche des bactéries transformées p48

III.4. Séquençage du fragment amplifié p48

III.5. southern blot p49
* 5.1. Marquage de la sonde p49
* 5.2. Préparation de la membrane p50

IV. Procédures expérimentales d'induction de la différenciation des tachyzoïtes vers le stade bradyzoïte p51

IV.1. Modification du pH p51

IV.2. Modification de la température p51

IV.3. Arsenite de sodium p52

IV.4. Interféron gamma p52

IV.5. Utilisation d'inhibiteurs de la chaine respiratoire mitochondriale p52

RESULTATS p53

I. Etude *in vitro* de la différenciation spontanée des zoïtes de *Toxoplasma gondii* p54

I.1. Conversion du stade bradyzoïte vers le stade tachyzoïte (souches 76K et BQNC2) p54

I.2. Conversion du stade tachyzoïte vers le stade bradyzoïte (souche Prugniaud) p56

I.3. Conversion des sporozoïtes (souche 76K) p56

II. Etude expérimentale de la conversion du stade tachyzoïte vers le stade bradyzoïte p57

II.1. Traitements inducteurs / Analyse semiquantitative par des techniques d'IF p57
* 1.a. Modification du pH p58
* 1.b. Modification de la température p59
* 1.c. Arsenite de sodium p60

* 1.d. Interféron gamma p60

II.2. Comparaison de l'effet des divers traitements sur l'induction de l'expression de la P36 et sur l'inhibition de la multiplication des parasites p61

III. Etude ultrastructurale de la conversion du stade tachyzoïte vers le stade bradyzoïte, *in vitro* p63

IV. Caractérisation d'une protéine spécifique du stade bradyzoïte: la protéine P18 (souche pK) p65

IV.1. La protéine P18: protéine de surface p65

IV.2. Marquages métaboliques p65

IV.3. Microséquençage de la P18 p65

DISCUSSION p68

I. Etude *in vitro* de l'interconversion de stade p69
I.1. Les marqueurs spécifiques de stade p69
I.2. Caractérisation biochimique et moléculaire de la P18 p71
I.3. Description des événements survenant au cours de la conversion p72
A. Démonstration de l'existence du mécanisme de conversion *in vitro* p72
B. Du stade tachyzoïte au stade bradyzoïte p73
C. Le retour vers la forme proliférative p78

II. Induction expérimentale de la conversion vers le stade bradyzoïte p80
II.1. Facteurs susceptibles d'influencer la conversion p80
- la souche de parasite p80
- Le parasite p81
II.2. Les voies d'induction p82
* 2.1. Le rôle du pH p82
* 2.2. Le rôle de la température et des protéines de stress p82
* 2.3. Le monoxyde d'azote et l'inhibition de la chaine respiratoire mitochondriale p85

CONCLUSIONS et perspectives p90

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES p91

PLANCHES p105

- **Planche I:** *Etude de l'expression de protéines spécifiques de stade par IF au cours de la conversion des tachyzoïtes en bradyzoïtes.* p106

- **Planche II:** *Etude par IF de l'expression d'une molécule spécifique de la paroi kystique (116kDa) au cours de la conversion.* p107

- **Planche III:** *Action d'inhibiteurs de la chaîne respiratoire mitochondriale et du milieu pH8 sur l'induction de l'expression d'une protéine spécifique de bradyzoïte (P36).* p108

- **Planche IV:** *Influence de divers traitements inducteurs de la différenciation vers le stade bradyzoïte sur le taux de croissance des parasites.* p109

- **Planche V:** *Etude ultrastructurale de la conversion des tachyzoïtes en bradyzoïtes (temps 24h et 48h, milieu pH8).* p110

- **Planche VI:** *Observations ultrastructurales de "kystes" obtenus in vitro en milieu pH8.* p111

- **Planche VII:** *Immunolocalisation sur coupes à congélation d'une protéine spécifique de la paroi kystique (116kDa).* p112

- **Planche VIII:** *Immunolocalisation ultrastructurale des protéines GRA2, GRA3, et d'une protéine spécifique de bradyzoïte (la P21) au cours de la conversion de stade.* p113

- **Planche IX:** *Immunolocalisation sur coupes à congélation d'une protéine de 18kDa, spécifique du bradyzoïte, au cours de la conversion de stade.* p114

- **Planche X:** *Caractérisations biochimiques de la protéine P18 (biotinylation, marquages métaboliques).* p115

- **Planche XI:** *Caractérisation moléculaire de la P18.* p116

ANNEXE p117

- article 1

- article 2

GENERALITES

I. HISTORIQUE

Toxoplasma gondii est un protozoaire parasite intracellulaire obligatoire. Il fut décrit la première fois par Nicolle et Manceaux en 1908 chez un petit rongeur africain "Ctenodactylus gondi". Le toxoplasme doit son nom à sa forme arquée (Toxon en grec = arc).

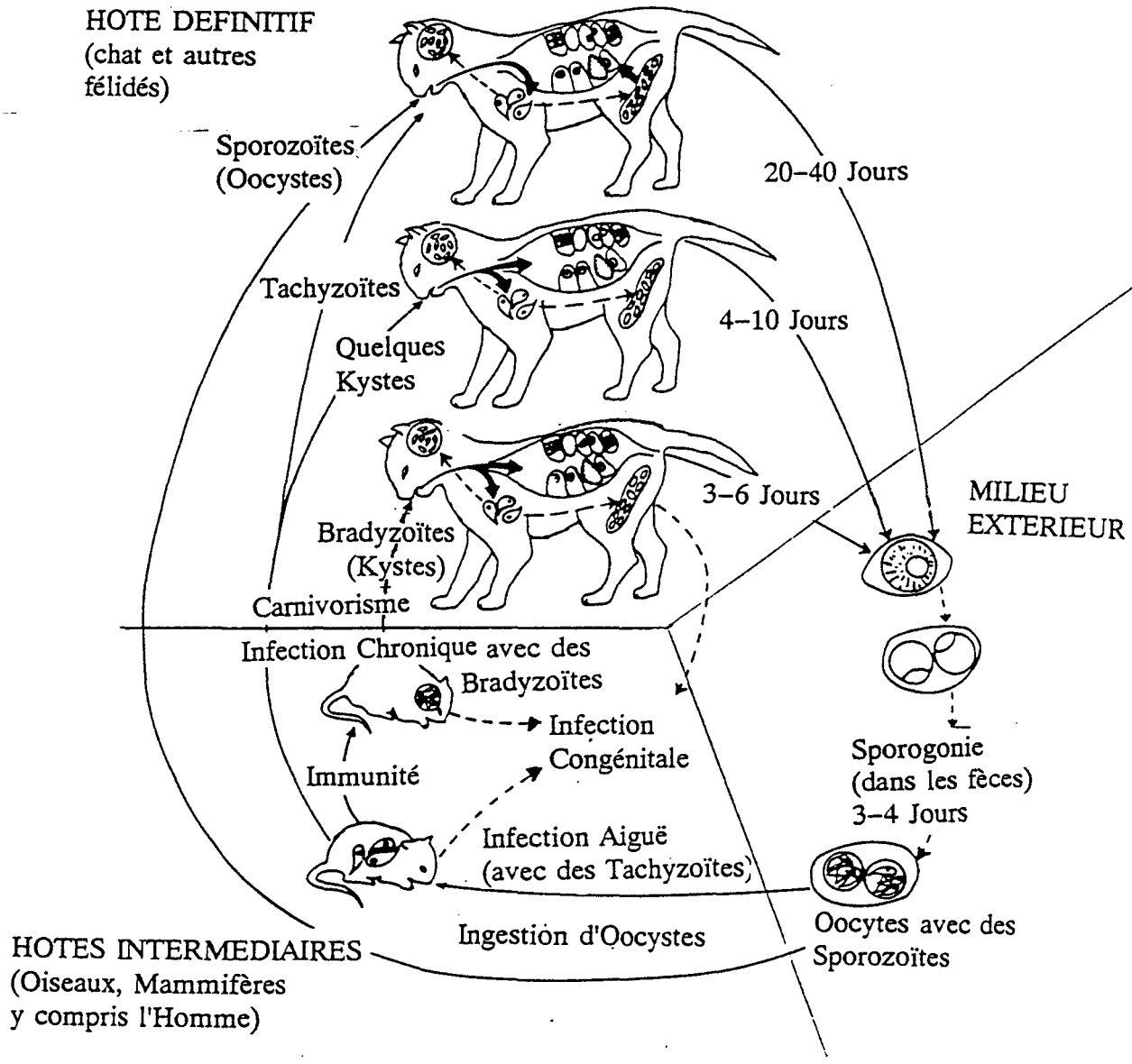
La première toxoplasmose humaine a été observée en 1923 (Janku *et al*). Et ce n'est qu'en 1970 que le cycle biologique de cet organisme est élucidé complètement (Work et Hutchison, 1969; Hutchison *et al*, 1970; Frenkel *et al*, 1970).

Sa classification systématique proposée par Levine *et al* (1980) est la suivante:

embranchement	**PROTOZOA**	(Goldfuss 1918)
phylum	**APICOMPLEXA**	(Levine 1970)
classe	**SPOROZOA**	(Leuckart 1879)
sous classe	**COCCIDIA**	(Leuckart 1879)
ordre	**EUCOCCIDIA**	(Leger et Duboscq 1879)
sous ordre	**EIMERIINA**	(Leger 1911)
famille	**SARCOCYSTIDAE**	(Poche 1913)
sous famille	**TOXOPLASMATINAE**	(Biocca 1957)
genre	**TOXOPLASMA**	(Nicolle et Manceaux 1909)
espèce	**GONDII**	

Le genre Toxoplasma ne contient qu'une seule espèce.

Schéma 1. **CYCLE EVOLUTIF de TOXOPLASMA GONDII**



II. CYCLE BIOLOGIQUE (schéma 1)

Ce parasite possède un cycle hétéroxène. Les hôtes intermédiaires (chez lesquels se déroule la multiplication asexuée) regroupent tous les homéothermes dont l'Homme. L'hôte définitif (reproduction sexuée) est un félidé, le chat en particulier.

Le parasite peut exister sous 3 formes infectieuses:

- le **tachyzoïte**: forme proliférative responsable de la toxoplasmose aigue.
- le **bradyzoïte**: retrouvé à l'intérieur d'un kyste, forme latente présente en phase chronique.
- le **sporozoïte**: issu de la phase sexuée, contenu dans un oocyste, forme de résistance dans le milieu extérieur.

Cycle sexué

L'hôte définitif (le chat) s'infeste le plus souvent par ingestion de kystes (carnivorisme de petits rongeurs) ou d'oocystes. Les enzymes protéolytiques du tractus digestif digèrent la paroi kystique ou de l'oocyste. Les bradyzoïtes ou sporozoïtes libérés pénétrent dans les cellules épithéliales de l'intestin, à l'intérieur desquelles les parasites se multiplient par schizogonie (reproduction asexuée) produisant des mérozoïtes. Ces mérozoïtes vont engendrer (au cours de la gamétogénèse) des microgamètes males et macrogamètes femelles qui produiront des oocystes après fécondation. Les oocystes sont excrétés dans le milieu extérieur, leur maturation produit 2 sporocystes renfermant chacun 4 sporozoïtes. Cet oocyste sporulé très résistant aux agents physiques et chimiques, peut être ingéré par un chat; un nouveau cycle sexué est initié. S'il est ingéré par un hôte intermédiaire, le cycle asexué se déroule.

Cycle asexué

Ce cycle résulte de l'ingestion d'oocystes présents dans les aliments souillés ou de kystes contenus dans de la viande parasitée. Les bradyzoïtes ou sporozoïtes libérés après action des enzymes protéolytiques, envahissent les cellules intestinales.

Ils donnent naissance à des tachyzoïtes qui se disséminent par voie sanguine et lymphatique dans l'organisme. Les parasites vont ensuite s'enkyster sous forme bradyzoïte au niveau de tissus tels les muscles ou le cerveau, lorsque l'animal survit à cette phase aigue.

Les cycles sexué et asexué peuvent se maintenir indépendamment l'un de l'autre. Les hôtes définitifs peuvent réaliser un cycle complet sans passage obligatoire chez l'hôte intermédiaire.

III. LA TOXOPLASMOSE

C'est une maladie généralement asymptomatique sans conséquences pathologiques graves chez l'homme. La proportion de la population infectée en France avoisine les 75%.

La toxoplasmose peut se révéler dangereuse au cours de 2 circonstances: lors d'une primo infection chez la femme enceinte (toxoplasmose congénitale), ou lors d'une immunodéficience (réactivation toxoplasmique).

III.1. Toxoplasmose congénitale

La contamination du foetus se fait par voie transplacentaire lors d'une primo infection chez la femme enceinte. Le risque d'infection chez la femme enceinte est de 0,5% en France, le nombre de toxoplasmoses congénitales serait compris entre 700 et 3000 par an (Dupouy - Camet, Gavinet *et al*, 1993).

Le risque de transmission materno - foetale augmente avec l'âge de la grossesse. La contamination du foetus au début de grossesse peut être responsable d'atteintes céphaliques particulièrement graves, pouvant même entraîner l'avortement. Par contre, l'atteinte tardive de gravité moindre peut se traduire par une toxoplasmose congénitale latente. Une rechute peut survenir après de très longs délais, généralement lors de la puberté, avec le plus souvent des manifestations occulaires (Ambroise - Thomas and Pelloux 1993a et b).

III.2. Toxoplasmose de l'immunodéprimé

+ Cas des transplantés et des greffés

Deux types de toxoplasmose peuvent survenir chez ces individus:

- Une infection généralisée peut se produire chez le transplanté non immun et soumis à un traitement immunosuppresseur qui reçoit un greffon parasité (kyste).
- Une réactivation endogène de la toxoplasmose peut survenir chez les greffés de moëlle, suite à une thérapeutique supprimant leur réponse immune.

+ Cas du SIDA

La toxoplasmose est la deuxième infection opportuniste liée au VIH, derrière

la pneumocytose pulmonaire (Morlat, Ragnaud *et al*, 1993).

Au cours du SIDA une réactivation endogène de la toxoplasmose (rupture des kystes et propagation des tachyzoïtes) survient suite à l'effondrement de l'immunité cellulaire. Elle se manifeste le plus souvent par des atteintes neurologiques (céphalite fébrile, troubles du comportement, méningoencéphalite, ...). Des lésions occulaires (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 1991) peuvent être également observées.

En France la fréquence annuelle de la toxoplasmose cérébrale varie de 9,5 à 18% des cas de SIDA.

Diagnostic

Le diagnostic biologique consiste en la mise en évidence dans le sérum, d'anticorps spécifiques signant une infection évolutive ou récente (détection d'IgM et IgA) ou une infection ancienne (détection essentiellement d'IgG) ou à la mise en évidence du parasite lui – même.

Le test de référence est le "Dye test" (Sabin, 1949) qui repose sur la lyse du parasite en présence de complément par activation de la voie classique (Schreiber and Feldman, 1980). La technique d'immunofluorescence indirecte sur parasites fixés est également utilisée.

La détection des parasites dans les prélévements biologiques (liquide Broncho – Alvéolaires, Liquide Céphalo – Rachidien, humeur aqueuse) peut être réalisée par mise en culture des parasites *in vitro*, par inoculation à des souris, ou par examen microscopique direct (Derouin, Sarfati *et al* 1989). Ces méthodes, d'application laborieuse et nécessitant parfois des délais de plusieurs semaines sont de plus en plus délaissées, au profit d'une nouvelle méthode basée sur l'amplification par Polymerase Chain Reaction (PCR) de fragments de gènes du parasite. Cette technique, fiable et rapide (Burg *et al*, 1989) est d'un grand intérêt pour le diagnostic de la toxoplasmose congénitale ou chez les patients immunodéprimés (Holliman *et al*, 1990).

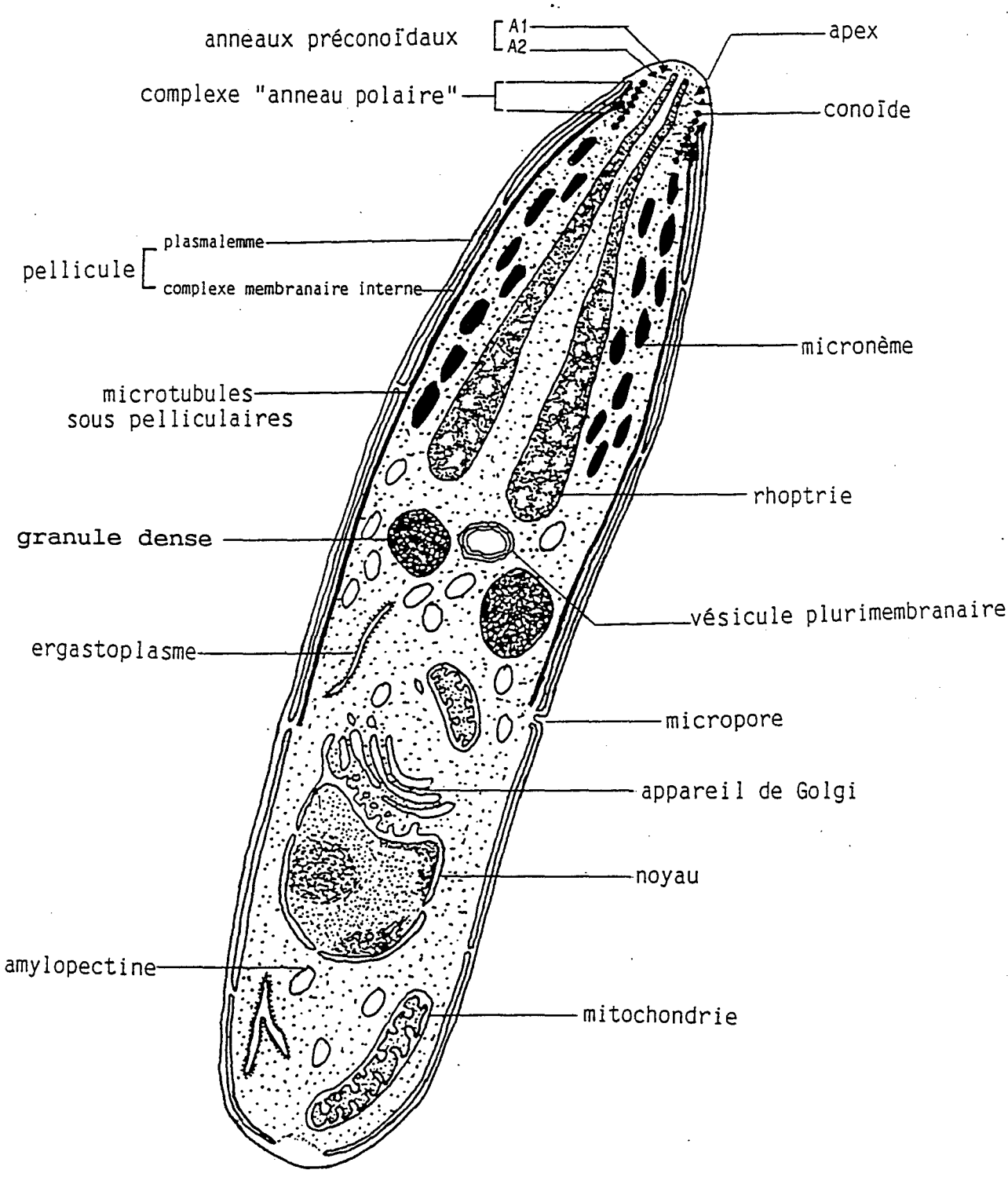
Traitements

De nombreuses drogues sont actives sur *Toxoplasma gondii*, telles les

macrolides (Spiramycine) perturbant la synthèse des protéines parasitaires, les sulfamides, ou les inhibiteurs de la dihydrofolate réductase (pyrimethamine). L'association pyriméthamine – sulfadiazine inhibant la voie de synthèse des folates et perturbant secondairement la synthèse des bases puriques, se révéle être efficace pour le traitement de l'infection aigue, mais ne permet pas l'éradication des kystes. Bien que de nombreux effets secondaires soient observés, ce traitement est couramment utilisé pour les femmes enceintes contaminées et les patients immunodéprimés (Fortier and Ajana, 1992; Leport and Remington 1992). Jusqu'à maintenant, aucun traitement ne s'est révélé vraiment efficace contre la phase chronique de l'infection.

Des immunothérapies utilisant des cytokines comme l'interleukine – 2 (IL–2) recombinante, ou l'interféron gamma recombinant sont en cours d'expérimentation. L'emploi de l'interféron gamma qui présente une action synergique avec la pyriméthamine et la clindamycine (Israelski and Remington, 1990) est envisagé pour le traitement d'encéphalites toxoplasmiques (Leport and Remington, 1992; Suzuki and Remington, 1993).

Schéma 2. **Organisation ultrastructurale d'un zoïte de sporozoaire**



IV. LE TOXOPLASME

IV – 1. Structure du zoïte (schéma 2)

Le tachyzoïte de *Toxoplasma gondii* est de forme allongée de 6 à 8 μm de long et de 2 à 3 μm de large. Son extrémité postérieure est arrondie, son extrémité apicale est plus effilée. Il présente une organisation particulière avec des caractéristiques communes à tous les sporozoaires. Les bradyzoïtes et sporozoïtes présentent une organisation proche de celle du tachyzoïte.

Les zoïtes sont des cellules hautement différenciées comprenant les organites classiques de toute cellule eucaryote (noyau, mitochondrie, appareil de Golgi, réticulum endoplasmique), des organites spécifiques (rhoptries, micronèmes, granules denses, conoïde, microtubules sous pelliculaires) et une pellicule trimembranaire particulière.

– La pellicule

Le parasite est entouré d'une pellicule de 60 nm d'épaisseur (Vivier et Petitprez, 1969) composée d'une membrane externe, le plasmalemme, et d'un complexe interne bimembranaire. Les études en cryofracture (Porchet et Torpier, 1977) ont montré que le complexe membranaire interne est constitué de vésicules aplaties juxtaposées arrangées en plaques longitudinales convergeant toutes vers l'extrémité postérieure selon un tracé spiralé. Dans la partie antérieure elles s'insèrent sur une plaque tronconique qui constitue la cape apicale.

Les membranes du complexe interne contiennent des alignements longitudinaux parallèles de particules intramembranaires. Certaines rangées sont doubles et correspondent en disposition et en nombre aux microtubules sous pelliculaires qui s'étendent sur les deux tiers antérieurs du zoïte.

Ce complexe est interrompu au niveau de l'extrémité apicale ou se trouve le conoïde qui est surmonté par deux anneaux apicaux.

– Le complexe apical

Il se localise dans la région antérieure du parasite, c'est une des caractéristiques des Apicomplexa. Il comprend le conoïde, les rhoptries, les

micronèmes, et les granules denses.

*** Le conoïde**

Il est constitué de structures fibrillaires enroulées en spirale. L'anneau polaire situé à la base du conoïde sert d'insertion à 22 microtubules longitudinaux. Ces microtubules ont vraisemblablement une fonction cytosquelettique organisant le complexe membranaire interne (Schwartzman, 1985; Nagel and Boothroyd, 1988; Foussart *et al*, 1990).

*** Les Rhoptries** (Senaud 1967)

Ce sont des organites en forme de massues allongées, logés dans le tiers antérieur de la cellule, et présentant un aspect spongieux chez le tachyzoïte. Le col ou pédoncule (Vivier and Petitprez, 1972), dense aux électrons s'insinue dans le conoïde. Les rhoptries sont considérées comme des organites secrétoires qui vident leur contenu au moment de l'invasion de la cellule hôte par le parasite.

*** Les granules denses**

Ce sont des organites cytoplasmiques de 0,2 μm de diamètre, au contenu homogène et dense aux électrons. Ils se trouvent répartis de part et d'autre du noyau.

*** Les micronèmes**

Ce sont des organites plus petits au contenu dense en forme de courts batonnets, et logés dans le tiers ou la moitié antérieure du zoïte.

Une vacuole plurimembranaire située près du Golgi, pourrait contenir un DNA circulaire apparenté aux plastes.

- Différences morphologiques entre le tachyzoïte et le bradyzoïte

Les bradyzoïtes sont plus riches en micronèmes et grains d'amylopectine qui constitue une réserve polyssacharidique, et ils possèdent des rhoptries à contenu homogène et dense. Leur noyau présente une position plus postérieure.

Les bradyzoïtes sont renfermés au sein d'une structure kystique, les tachyzoïtes se multiplient au sein d'une vacuole parasitophore. La paroi kystique est délimitée par

une membrane doublée sur sa face interne par une couche de tubules membranaires et de vésicules, apparement dérivées ou connectées à la membrane pariétale. Les bradyzoïtes sont inclus dans un matériel granulaire compact et dense aux électrons.

IV - 2. Invasion de la cellule hôte

Le parasite a une durée de vie limitée (quelques heures) en milieu acellulaire. Le passage par le stade intracellulaire est une étape obligatoire pour assurer sa survie et son développement.

Le processus d'infection d'une cellule hôte est artificiellement divisé en 2 étapes: une étape d'attachement suivie d'une étape d'invasion.

Toxoplasma gondii est capable d'envahir une large variété de types cellulaires, la reconnaissance de la cellule hôte passe donc vraisemblablement par des molécules communes aux différents types cellulaires. La laminine a été décrite comme impliquée dans l'invasion du toxoplasme dans des fibroblastes (Furtado *et al*, 1992).

Le parasite s'oriente par des mouvements de torsion de son cytosquelette afin de présenter son extrémité apicale pour l'invasion (Chiappino *et al*, 1984).

L'entrée du parasite dans une cellule est un mécanisme actif induit par le parasite. Elle commence par la création d'une jonction mobile. Au point d'invasion, il se forme une petite dépression de la membrane plasmique de la cellule qui se transforme en une calotte sphérique, puis en un anneau faisant jonction avec le parasite. Cette jonction mobile coulisse le long du parasite vers le pôle postérieur. A ce niveau la membrane entourant le parasite, se pince et se détache du plasmalemme. Le parasite se trouve alors isolé du cytoplasme de la cellule hôte dans une vacuole parasitophore qui ne fusionne pas avec les lysosomes (Jones and Hirsch; 1972, Jones *et al* 1972, Joiner; 1990). La membrane de la vacuole parasitophore néoformée est très différente de celle de la cellule hôte, et se caractérise par une absence de particules intra membranaires et de marqueurs de surface. Les protéines des rhoptries sont associées à la membrane vacuolaire dès l'invasion (Saffer *et al* 1992, Beckers *et al* 1994), les lipides contenus dans ces organites pourraient également contribuer à la formation de la vacuole (Foussard *et al*, 1990. En outre, une molécule de rhoptries (ROP1; le PEF: Penetration Enhancing Factor) aurait la propriété d'augmenter la capacité de pénétration du parasite. Aussitôt après l'invasion,

les granules denses sont exocytés dans la vacuole (Cesbron *et al*; 1989, Leriche *et al* 1990, Achbarou *et al*; 1991, Safer *et al*; 1992) leur contenu participe à la formation d'un réseau tubulo membranaire intravacuolaire formé de longs tubules contournés et connectés à la membrane de la vacuole parasitophore (Nichols *et al*; 1983).

La vacuole au sein de la cellule hôte se trouve rapidement entourée par des mitochondries ou du réticulum endoplasmique de la cellule hôte.

Une fois installé au sein d'une vacuole parasitophore, le parasite va se multiplier par un processus d'endodyogénie: un parasite donne naissance à 2 cellules filles. Le cycle cellulaire est synchrone au sein d'une vacuole et dure de 5 à 10 heures selon les souches parasitaires. Au cours de la division, le noyau reste différencié; contrairement à la mitose chez les eucaryotes supérieurs, la membrane nucléaire reste intacte et les chromosomes ne se condensent pas à la métaphase.

La membrane de la vacuole s'étend au fur et à mesure des cycles de multiplication: l'origine de cette augmentation de surface membranaire n'est pas connue. Récemment l'existence de pores laissant passer des molécules de 1200 daltons a été mise en évidence dans cette membrane (Schwab *et al* 1994).

Lors de la sortie du parasite de la cellule hôte, celui ci redevient mobile. Il semble que ce phénomène soit lié à la concentration calcique environnante. En effet un traitement par des ionophores calciques entraine la reprise de mobilité du parasite et leur libération hors de la cellule (Endo *et al*, 1982).

Cette description de l'invasion correspond à l'entrée active d'un parasite dans une cellule. Dans certains cas, le parasite peut aussi être phagocyté par un macrophage ou une autre cellule phagocytaire, le phagosome formé fusionne dans ce cas avec les lysosomes, et le parasite est tué.

IV – 3. Enkystement

Le parasite, après dissémination par voie hématogène se retrouve dans les organes et en particulier dans le système nerveux central. Cette colonisation se ferait soit par pénétration active du parasite (forme tachyzoïte) à travers l'épithélium des vaisseaux sanguins, soit de façon passive par l'intermédiaire des cellules du système réticulo – histiocytaire (macrophages, monocytes, histiocytes, cellules gliales). Une étude ultrastructurale de l'évolution des parasites dans le cerveau de souris, a été

effectuée par Ferguson and Hutchison (1987a). Les parasites sont présents dans le cerveau 7 jours après l'infection. Des lésions nécrotiques et des nodules inflammatoires sont associés à des petits groupes de parasites qui présentent les éléments caractéristiques de tachyzoïtes. Les parasites peuvent être observés à la fois dans les cellules inflammatoires, les macrophages, les neutrophiles et les neurones. Ces groupes vont peu à peu diminuer au cours de l'infection. Des formations kystiques apparaissent entre le onzième et quatorzième jour de l'infection; une modification de la vacuole parasitophore est observée: la membrane s'enrichit d'un matériel dense et présente un aspect de plus en plus ondulé avec de nombreuses petites invaginations vers la lumière, les parasites regroupés dans ces structures possédent alors les caractéristiques du tachyzoïte. A partir du vingtième jour, les tachyzoïtes semblent avoir disparu ainsi que les lésions inflammatoires, les parasites regroupés dans les kystes possédent les caractéristiques des bradyzoïtes: richesse en micronèmes et grains d'amylopectine. Les invaginations de la membrane de la paroi kystiques sont plus nombreuses et plus étendues. Les parasites sont étroitement serrés les uns contre les autres, et certains sont encore en cours d'endodyogénie. Après 6 mois il devient extrêmement rare de retouver des parasites entrain de se multiplier au sein des kystes. Pavesio *et al* (1992) ont observé l'existence de bradyzoïtes dégénérés au sein de certains kystes âgés.

La taille des kystes semble augmenter jusqu'au sixième mois de l'infection. La structure de la paroi est globalement similaire à celle décrite au vingtième jour. L'épaisseur de la paroi semble plus importante ainsi que la profondeur et le nombre d'invaginations présentes dans la membrane.

Les kystes sont observés exclusivement au sein des neurones apparemment vivants; aucun signe inflammatoire n'est observé à proximité (Ferguson and Hutchison, 1987b).

Ferguson *et al* (1989) ont montré qu'une rupture "spontanée" des kystes pouvait se produire, bien que ce soit un événement rare. Une réponse inflammatoire immédiate est alors déclenchée, ce qui limite les dommages potentiels enclenchés par la libérations des parasites chez l'hôte immunocompétent, et explique que l'infection chronique passe inaperçue.

IV - 4. Structure moléculaire

Un nombre croissant de molécules parasitaires ont été caractérisées au cours de ces dernières années.

Certaines sont spécifiques de souches (Ware *et al*, 1987), d'autres sont corrélées au degré de virulence (Dardé *et al*; 1988, Gross *et al*; 1991, Bohne *et al*; 1993), d'autres encore sont spécifiques de stade (Lunde and Jacob; 1983, Kasper; 1989).

Les molécules membranaires

Cinq antigènes majeurs de surface on été décrits, de 22, 23, 30, 35, et 43 kDa (Handman *et al*; 1980, Couvreur *et al*; 1988), et récemment un sixième de plus faible poids moléculaire: 4,6 kDa (Tomavo *et al*, 1994). Ces molécules sont maintenant dénommés SAG 1, 2,..., d'après la nomenclature proposée par Sibley *et al* (1991). Les gènes de la P30: SAG1 (Burg *et al*, 1988), de la P22: SAG2 (Prince *et al*, 1990) et de la P43: SAG3 (Cesbron *et al*, 1994) ont été clonés et séquencés.

Ces 6 molécules de surface sont ancrées dans la membrane par un groupement glycosylphosphatidylinositol (GPI) composé d'un groupement phosphatidyl inositol et d'un glycanne comprenant de la glucosamine du mannose et de l'ethanolamine (Nagel *et al*; 1989, Tomavo *et al* ; 1989). Les précurseurs de la synthèse de ce groupement GPI ont été identifiés (Tomavo *et al*, 1992).

La protéine de 23 Kd est N glycosylée (Tomavo *et al*, 1993).

La protéine de 30 Kd (SAG 1) est la plus abondante, elle représente environ 5% des protéines totales. Elle semble jouer un rôle dans l'invasion de la cellule hôte, des anticorps dirigés contre SAG 1 sont capables en effet d'inhiber l'invasion (Grimwood and Smith, 1992). L'existence d'un récepteur glycosylé qui fixe SAG 1 a été démontré à la surface des cellules hôtes (Kasper and Kahn, 1993). Cependant la capacité à envahir et à se multiplier ne semble pas être altérée chez des mutants parasitaires dépourvue de SAG 1 (Kasper *et al*, 1987).

Les protéines du complexe apical

Une vingtaine de molécules ont été caractérisées (Sadak *et al*; 1988, Leriche *et al*; 1991, Achbarou *et al*; 1991).

- *Les protéines des rhoptries:*

Elles semblent impliquées dans les phénomènes d'invasion, les mécanismes précoces de formation et modification de la vacuole parasitophore (Kimata and Tanabe 1987, Dubremetz *et al* 1992, Saffer *et al* 1992). Des anticorps monoclonaux ont permis d'identifier une dizaine de molécules associées aux rhoptries (Dubremetz *et al* 1987, Sadak *et al* 1988, Schartzman and Krug 1989, Bonhomme *et al* 1990). La molécule ROP1 a été mise en évidence par son activité d'augmenter la pénétration: c'est le PEF Penetration Enhancing Factor (Lycke *et al* 1975). Les molécules ROP1 et ROP2 ont été clonées et séquencées.

- *Les protéines des micronèmes:*

Trois molécules ont été identifiées (Achbarou *et al*, 1991): Mic 1 (60 kd), Mic 2 (120 Kd), Mic 3 (90 Kd). Elle sont communes aux stades tachyzoïte et bradyzoïte. Leur fonction exacte n'est pas connue. Dans d'autres genres proches du toxoplasme; *Eimeria*, *Sarcocystis* et *Plasmodium*, les molécules des micronèmes sont impliquées dans les phénomènes de reconnaissance ou d'attachement du parasite sur la cellule hôte (Entzeroth *et al*; 1992, Adams *et al*; 1990).

- *Les protéines des granules denses:*

Elles constituent l'essentiel des Antigènes Excrétés Secrétés (Darcy *et al*, 1988) molécules retrouvées dans le surnageant de culture de cellules infectées. Ces molécules sont secrétées dans la vacuole parasitophore après invasion (Cesbron Delauw *et al*; 1989, Charif *et al*; 1990, Leriche and Dubremetz; 1990, et 1991, Achbarou *et al* 1991, Sibley and Boothroyd; 1992, Dubremetz *et al*; 1993).
6 molécules (GRA1 à GRA 6) ont été séquencées. La molécule GRA1 (23Kd) sécrétée par les granules denses après l'invasion de la cellule hôte, est distribuée de façon homogène dans la matrice de la vacuole parasitophore (Cesbron - Delauw *et al*; 1989, Leriche and Dubremetz; 1990, Achbarou *et al*; 1991). L'antigène GRA2 (28 Kd) est détecté en étroite association avec le réseau membranaire intravacuolaire et dans la paroi des kystes (Charif *et al*; 1990, Torpier *et al*; 1993). La molécule GRA3 (30 Kd) est associée au réseau de la vacuole parasitophore ainsi qu'à sa membrane (Achbarou *et al*, 1991). L'antigène GRA4 (40 Kd) est également associé au réseau de la vacuole après l'invasion (Achbarou *et al*; 1991, Mévelec *et al*; 1992). L'antigène GRA5 (21 Kd) est détecté dans la membrane de la vacuole parasitophore et dans la

paroi des kystes (Torpier *et al*; 1993, Lecordier *et al*; 1993).

Une hydrolase nucléoside triphosphate a été charactérisée biologiquement (Asaï *et al* 1983). Cette enzyme est localisée dans les granules denses (Sibley *et al* 1994). Son poids moléculaire varie de 240 à 260 Kd. Cette activité semble spécifique au toxoplasme.

Les antigènes spécifiques de stade

Les 2 protéines de surface SAG1 (30Kd) et SAG2 (22 Kd) sont spécifiques des tachyzoïtes, elles ne sont détectées ni chez le bradyzoïte, ni chez le sporozoïte (Kasper, 1989). La protéine de surface de 43 Kd, quant à elle, est commune aux 3 stades parasitaires.

Deux antigènes spécifiques des sporozoïtes ont été rapportés, de 67 et 25 Kd (Kasper *et al*, 1984).

Omata *et al* (1989) ont identifié un antigène cytoplasmique de 20 Kd, présent dans le cytoplasme des bradyzoïtes exclusivement. Plusieurs anticorps monoclonaux spécifiques d'antigènes de bradyzoïtes ont été caractérisés récemment: Weiss *et al* (1992) ont identifié un antigène de 116 Kd localisé dans la paroi kystique et un antigène cytoplasmique de 28 Kd, Bohne *et al* (1993) ont décrit 2 antigènes dont l'un semble de surface, Woodison and Smith (1990) un antigène localisé dans la matrice des kystes. Au laboratoire, notre groupe (Tomavo *et al*, 1991) a caractérisé des anticorps monoclonaux reconnaissant 4 antigènes pelliculaires de 36, 34, 21 et 18 Kd spécifiques du stade bradyzoïte.

Récemment, la caractérisation moléculaire d'une protéine spécifique des bradyzoïtes a été réalisée (Parmley *et al* 1994). Cette protéine de 65 Kd serait localisée dans la parois kystique.

V. LA REPONSE IMMUNE à l'infection par *Toxoplasma gondii*

Lors de la phase aigue de l'infection, les tachyzoïtes se retrouvent disséminés dans divers tissus comme le foie, les tissus lymphoïdes, le poumon, ou le cerveau, provoquant des réactions inflammatoires avec formation de petits foyers de nécrose. Avec la mise en place de la réponse immune, les tachyzoïtes vont être progressivement éliminés, et les foyers de nécrose vont se resorber. Les conséquences pathologiques de l'infection sont donc limitées. Le parasite persiste alors sous forme bradyzoïte au sein de kystes préférentiellement localisés dans le système nerveux central, en l'absence de toute réaction inflammatoire. L'enkystement est en fait, un moyen pour le parasite d'échapper à la réponse immune et de se maintenir sous une forme chronique inoffensive pour l'hôte. Il est généralement admis que la rupture périodique de kystes, entraînant une forte réponse inflammatoire provoquant la destruction rapide des parasites ainsi libérés, est responsable d'une stimulation continuelle de la réponse immune anti - toxoplasme. Une immunité protectrice contre une réinfection est ainsi générée chez l'hôte immunocompétent. En cas d'immunodéficience, les bradyzoïtes libérés des kystes peuvent se transformer en tachyzoïtes. Le parasite prolifère alors rapidement et provoque de graves lésions tissulaires (Suzuki *et al*; 1989b, Gazzinelli *et al*; 1993a). Ainsi chez les patients atteints du SIDA, cela se manifeste généralement sous forme de toxoplasmose cérébrale au pronostic fatal.

Depuis la recrudescence de la toxoplasmose cérébrale chez les sidéens, les recherches se sont intensifiées sur l'exploration des composantes immunologiques intervenant dans le contrôle de l'infection chronique (compréhension du phénomène d'enkystement, et de réactivation de l'infection) dans le but de restaurer une résistance à *Toxoplasma gondii* chez les patients immunodéprimés.

Les composantes de la réponse immunitaire

L'infection par *Toxoplasma gondii* entraine une réponse immunitaire forte et persistante, à la fois humorale et à médiation cellulaire (Krahenbuhl and Remington, 1982).

1 - l'IMMUNITE A MEDIATION HUMORALE

Le rôle de l'immunité humorale a été étudié par des expériences de transfert passif de sérum immuns et a donné lieu à des résultats parfois contradictoires. Certains auteurs (Foster and McCulloch; 1968, Gill and Prakash; 1970) ont montré l'absence d'activité protectrice de tels transferts d'anticorps contre une infection primaire avec des souches virulentes. Par contre d'autres groupes (Masihi and Werner; 1978, Johnson *et al*; 1983, Sharma *et al*; 1984) ont montré que le transfert passif de sérum immuns, ou d'anticorps monoclonaux, pouvait entraîner une certaine protection chez des souris infectées avec des souches modérément virulentes. De même, il a pu être observé que le traitement de souris avec des anticorps anti μ induisant la suppression de la production d'anticorps provoquait l'exacerbation de la maladie.

Les anticorps (notamment les immunoglobulines IgA) peuvent également constituer une barrière locale contre une infection orale avec des kystes. L'induction d'une immunité mucosale à médiation humorale semble donc importante et fait l'objet d'une stratégie à visée vaccinale (Chardes *et al*, 1993).

2 - LES MECANISMES A MEDIATION CELLULAIRE

Bien que les composantes du système immunitaire murin soient sans doute différentes de celle de l'homme, la souris a été le principal modèle utilisé pour l'étude des mécanismes impliqués dans la résistance à l'infection par le toxoplasme.

Il semble que l'interféron gamma soit le facteur majeur impliqué dans la résistance à l'infection chez la souris. En effet, la déplétion en interféron gamma par des anticorps neutralisants rend une souris susceptible à une primo infection avec une souche avirulente et l'administration de tels anticorps chez une souris infectée chroniquement est capable d'entraîner une réactivation de la toxoplasmose (Gazzinelli *et al*; 1992a, Suzuki *et al* 1989b).

Un rôle majeur des cellules T dans le contrôle de l'infection a été suggéré. En effet, des souris "nude", athymiques, sont extrêmement susceptibles à *Toxoplasma gondii*, et le transfert de cellules spléniques ou lymphoïdes permet de rétablir une protection (Lindberg and Frenkel 1977, Schluter *et al* 1991).

D'autres composantes de la réponse immune à médiation cellulaire, tels les macrophages et les cellules NK (Natural Killer) sont également impliquées, et

semblent agir indépendamment des anticorps.

2 - 1. Contrôle d'une infection aigue:

- Activation non spécifique des macrophages et des cellules NK:

Toxoplasma gondii est capable d'activer de façon non spécifique les macrophages et les cellules NK dans les stades précoces de l'infection (Hauser *et al*, 1982 et 1983). Ce mécanisme d'activation semble agir indépendamment de la réponse immune dépendante des lymphocytes T. Des études récentes ont montré que les cellules spléniques de souris SCID (Severe Combined Immnuodeficient) qui ne possédent ni lymphocytes T ni lymphocytes B fonctionnels, sont capables de produire de l'interféron gamma en réponse à une infection par *Toxoplasma gondii* (Sher *et al*, 1993). Alors que les cellules NK ont été identifiées dans ce cas, comme la source majeure de production d'interféron gamma, il apparait que des facteurs solubles produits par les macrophages au cours de l'infection, sont nécessaires pour initier cette réponse (Bancroft *et al*; 1989, Sher *et al*; 1993). En effet, le TNF alpha et l'interleukine 12, produits par le macrophage activé par *Toxoplasma gondii*, agissent en synergie pour induire la production d'interféron gamma par les cellules NK (Gazzinelli *et al*, 1993b). *Toxoplasma gondii* est capable d'envahir un nombre varié de cellules, phagocytaires ou non. L'invasion de la cellule n'est pas nécessaire à l'activation des macrophages, et des antigènes secrétés par le parasite pourraient également activer des macrophages non infectés.

Il semble donc que, l'activation précoce des macrophages et la synthèse d'IFN gamma par les cellules NK qui en résulte, permettent une résistance précoce non spécifique contre la forme réplicative du parasite (les tachyzoïtes), avant la mise en place de la réponse immunitaire médiée par les cellules T.

- Les cellules T impliquées dans la résistance:

Les principaux lymphocytes T producteurs d'IFN gamma, connus, sont les cellules CD4+ et CD8+ appartenant à la population Th1. Au cours de l'infection par *Toxoplasma gondii*, ces 2 types cellulaires sont capables de produire cette cytokine en réponse à une stimulation par des antigènes parasitaires (Gazzinelli *et al*; 1991, Gazzinelli *et al*; 1992a). Un rôle essentiel des lymphocytes CD4+ a été montré avec une orientation vers la population Th1 productrice d'IFN gamma et d'Interleukine 2. De

récents travaux (Trinchieri *et al*, 1993) suggérent que l'interleukine 12 produite par les macrophages au cours de la phase précoce de l'infection joue un rôle important dans la voie de différenciation des cellules CD4+ vers la population Th1. Il a été montré que l'IFN gamma est un puissant inhibiteur de la prolifération des cellules Th2 (Gajewski and Fitch, 1988). Ainsi comme c'est le cas chez les Leishmanies (Scharton and Scott 1993), la production précoce d'IFN gamma par les cellules NK, qui pourrait supprimer la prolifération des cellules Th2, favoriserait la sélection des cellules CD4+ Th1.

Cependant, ce sont les lymphocytes CD8+ qui apparaissent comme l'effecteur majeur dans la résistance contre *Toxoplasma gondii in vivo*. Une vaccination par une souche de toxoplasme thermosensible ts-4 (Pfefferkorn and Pfefferkorn, 1976) induit une immunité protectrice lors d'une épreuve avec une souche virulente. La déplétion simultanée en cellules CD8+ et CD4+ abolit totalement cette protection; une déplétion des cellules CD8+ l'abolit partiellement, alors que celle des cellules CD4+ échoue à la réduire (Gazzinelli *et al*, 1991). Parallèlement, au cours d'une infection chronique, le contrôle de la rupture des kystes et de la réactivation dépend principalement des cellules CD8+ (Gazzinelli *et al*, 1992a). Des études menées sur différentes souches murines, ont montré que des gènes du complexe majeur d'histocompatiblité codant pour les molécules de classe I influencent la résistance à une primo infection (Brown and McLeod, 1990) et le contrôle d'une toxoplasmose cérébrale (Suzuki *et al*, 1991b). Or les cellules CD8+ ont pour cible préférentielle les cellules exprimant les molécules de classe I, cellules susceptibles d'être infectées par le parasite (Denker *et al*, 1993). Les cellules CD4+ ont un rôle important dans l'établissement de l'immunité au cours des phases précoces de l'infection (Araujo *et al*, 1991) et au cours d'une vaccination (Gazzinelli *et al* 1991). Les résultats suggèrent que les cellules CD8+ agissant en synergie avec les CD4 sont l'effecteur majeur, et que leur induction et leur activité optimale dépendent des cellules CD4 qui possèdent une fonction "Helper" grâce à la production de cytokines Th1 (IFN gamma et Interleukine 2). Le fait que des souris infectées avec un virus de leucémie murine LP-BM5 provoquant une réponse immune de type Th2, présentent une forte suceptiblité à *Toxoplasma gondii*, conforte cette hypothèse (Gazzinelli *et al*, 1992b).

Les cellules CD8+ seraient donc impliquées dans le maintien de la réponse immune protectrice (Parker *et al*, 1991). Ces cellules pourraient contrôler l'infection par deux

mécanismes possibles. Le premier, probablement le plus logique, dépendrait de la production d'IFN gamma (Gazzinelli *et al*, 1991), le rôle essentiel de cette cytokine dans l'immunité contre le toxoplasme étant bien établi à présent. L'activité cytotoxique contre des cellules infectées par *Toxoplasma gondii* (Yano *et al*, 1989) pourrait représenter le deuxième mécanisme d'action des lymphocytes CD8+, cellules restreintes par le complexe majeur d'histocompatibilité de classe I. Cependant cette activité cytolytique n'est démontrable qu'*in vitro*.

2 - 2. Contrôle de la toxoplasmose cérébrale:

La toxoplasmose cérébrale est devenue une cause majeure de mortalité chez les patients atteints du SIDA (Luft *et al*; 1984, Navia *et al*; 1986). La compréhension des mécanismes qui permettent le maintien de l'infection chronique sous une forme inoffensive (forme bradyzoïte enkystée) chez l'hôte immunocompétent, est fondamentale pour le contrôle de la réactivation de la toxoplasmose chez les hôtes immunodéficients. Le fait qu'une toxoplasmose cérébrale soit observée seulement au cours de déficiences du système immunitaire, indique que l'immunité doit jouer un rôle capital dans sa prévention.

Il semble que le patrimoine génétique joue un rôle dans le déroulement de la maladie. En effet, la résistance contre une infection aigue, la régulation du nombre de kystes, et le développement de la toxoplasmose cérébrale chez la souris sont contrôlés par un ou des gènes localisés dans la région D du Complexe Majeur d'Histocompatiblité (Brown and McLeod; 1990, Suzuki *et al*; 1991). Il est intéressant de noter que cette région apparait être liée étroitement avec des gènes contrôlant l'expression du TNF alpha (Freund *et al*; 1992). De plus, la capacité à induire une inflammation dans le cerveau au cours de la phase chronique est variable selon les souches de toxoplasme, certaines notamment la souche ME 49 peuvent même provoquer une réactivation spontanée de la toxoplasmose (Suzuki *et al*; 1989a). L'importance du patrimoine génétique de l'hôte et de la souche parasitaire dans le déterminisme de la pathogénèse et de la sévérité de la maladie se traduit par le fait que seulement 30% des sidéens séropositifs pour *Toxoplasma gondii* développent une toxoplasmose cérébrale (Suzuki and Remington, 1993).

Chez la souris, la déplétion en IFN gamma par des anticorps neutralisant entraîne une réactivation rapide de la toxoplasmose (Suzuki *et al*; 1989b). Parallèlement, l'administration d'IFN gamma provoque une diminution du nombre de kystes et une réduction de l'inflammation observée dans le cerveau de souris infectée chroniquement par la souche ME49; celle capable de réactiver spontanément (Suzuki *et al*, 1990). Cet effet n'est pas sous la dépendance exclusive des lymphocytes T, puisque des souris "nude" traitées avec de l'IFN gamma présentent une survie prolongée lors d'une infection (Suzuki *et al*, 1991a). La déplétion simultanée des lymphocytes CD4+ et CD8+ induit une réactivation comparable à celle observée chez les souris traitées par des anti IFN gamma, la déplétion en CD4 ou en CD8 par contre, n'a que peu d'effets (Gazzinelli *et al*; 1992a). Il apparaît donc que les 2 populations de lymphocytes sont capables de produire de l'IFN gamma *in vivo* de telle sorte que l'élimination seule, d'une d'entre elles échoue à provoquer une réactivation.

L'inoculation à une souris chroniquement infectée d'un rétrovirus murin (LP-BM5) peut provoquer également la réactivation de l'infection (Gazzinelli *et al*; 1992b, Watanabe *et al* 1993), ce rétrovirus engendre un syndrome similaire à celui développé par le HIV.

Les patients atteints du SIDA chez lesquels une baisse de production d'IFN gamma est observée (Murray *et al*, 1984) présentent une réactivation de la toxoplasmose préférentiellement au cours de la phase tardive de la maladie, lorsqu'à la fois les fonctions CD4 et CD8 sont supprimées (Shearer *et al*, 1986).
Au cours d'une infection à HIV, la réactivation de la toxoplasmose latente est induite lors de la réduction du nombre de lymphocytes T, mais également lors du basculement de la population CD4 Th1 vers la population CD4 Th2 ayant pour conséquence la réduction de la production d'IFN gamma et l'augmentation de la production des interleukines Il-4, Il-5, Il-6, et Il-10, qui ont un rôle plutôt immunosuppresseur.

En conclusion, l'IFN gamma joue un rôle prépondérant dans la résistance à une infection aigue et dans le contrôle de l'infection chronique. Son mécanisme d'action reste cependant à déterminer, car ses effets peuvent varier selon la cellule cible.
L'IFN gamma est un puissant activateur du métabolisme oxidatif des macrophages et de leur activité antimicrobienne (Nathan *et al*; 1983, Black *et al*; 1987). L'activité

toxoplasmicide du macrophage peut également passer par un mécanisme indépendant des dérivés de l'oxygène dépendant de la production de dérivés nitrés comme le monoxyde d'azote (Langermans *et al*, 1992). les études *in vitro* ont montré le rôle crucial de l'IFN gamma et du TNF alpha dans l'induction d'une NO synthétase (enzyme responsable de la formation de NO) et dans le contrôle de la multiplication intracellulaire des tachyzoïtes par les macrophages (Sibley *et al*, 1992). L'apparition d'une réactivation de la toxoplasmose déclenchée par un traitement par des anti IFN gamma ou par des anti TNF alpha s'accompagne d'une diminution de l'expression de la NO synthétase inductible (NOSi) dans le cerveau (Gazzinelli *et al*, 1992c) et d'une augmentation de l'expression de l'interleukine 10. Cette interleukine est connue pour inhiber la production de cytokines dans les macrophages activés (Fiorentino *et al*, 1991) ainsi que la production de NO.

Dans le système nerveux central, les cellules microgliales sont connues pour exprimer NOSi et donc sont capables de produire des niveaux élevés de NO (Chao *et al*, 1992). Récemment il a été montré que les cellules microgliales activées par l'IFN gamma peuvent contrôler la multiplication du parasite (Chao *et al*, 1993). Ces cellules phagocytaires seraient susceptibles d'être les cellules effectrices jouant le rôle de macrophage et permettant le contrôle de la réactivation de la toxoplasmose dans le cerveau.

L'utilisation prolongée de l'IFN gamma dans le traitement de la toxoplasmose chez les sidéens n'est pas envisagée par les cliniciens, en raison de son coût élevé et de ses effets secondaires. Actuellement l'utilisation de l'IL-12 comme traitement dans le contrôle de la toxoplasmose est à l'étude. En effet l'IL-12 en synergie avec l'IL-2 s'est avérée être un puissant activateur de la synthèse d'IFN gamma par les cellules NK. De récents travaux suggèrent que les cellules NK pourraient être une source secondaire d'IFN gamma lors d'une infection, donc compenser la perte du mécanisme de résistance dépendant des cellules T. Des souris SCID infectées par une souche avirulente présentent une survie prolongée allant jusqu'à la formation de kystes, lorsqu'elles sont traitées par l'IL-12 et l'administration d'anti IFN gamma élimine cette résistance (Gazzinelli *et al*, 1993).

VI. LA DIFFERENCIATION PARASITAIRE

La différenciation cellulaire chez les métazoaires se déroule de façon parallèle pour les différentes cellules d'un même organisme et aboutit à un état final totalement différencié. Chaque cellule subit un programme de différenciation bien déterminé. Au contraire, les protozoaires ont la particularité de subir des différenciations successives au cours de leur vie, qui donnent naissance à différents stades, ce qui est à l'origine d'un développement sous forme de cycle. Le protozoaire posséde donc divers programmes de différenciation se déroulant successivement (et parfois réversiblement) et non parallèlement comme chez les métazoaires.

Les protozoaires parasites sont sans doute parmi les unicellulaires ceux qui présentent les cycles les plus complexes. Les parasites passent par des phases de multiplication sexuée et asexuée (essentiellement par schizogonie) au cours de leur cycle de vie qui est souvent compliqué par l'existence de plusieurs hôtes.
Contrairement aux cellules des eucaryotes supérieurs qui ne peuvent tolérer trop longtemps des variations dramatiques de pH ou de température, les protozoaires parasites sont capables de survivre à des conditions environnementales extrêmes faisant partie intégrante de leur cycle de vie. Les modifications métaboliques et morphologiques subies par les parasites, conséquence d'un changement d'expression génique, coïncident fréquemment avec un changement d'hôte s'accompagnant de modifications dramatiques de leurs conditions de vie.

La différenciation de stade peut survenir après un changement d'environnement: la forme promastigote (forme infectieuse) chez les Leishmanies se transforme en forme amastigote après invasion des macrophages de l'hôte vertébré: cette forme est adaptée à la vie dans les tissus (Lawyer 1990).

La différenciation amenant le parasite au stade suivant du cycle, peut également anticiper sur le changement d'hôte ou le changement des conditions de vie. Chez *Trypanosome cruzi*, la forme infectieuse métacyclique de l'hôte vecteur, contrairement à la forme épimastigote, acquiert une résistance à la lyse par le complément préparant ainsi son passage futur dans la circulation sanguine de l'hôte vertébré où il se retrouve dans un environnement soumis à l'attaque du système immun. Le trypanosome africain existe dans la circulation sanguine de l'hôte

homéotherme sous diverses formes associées à des changements dans le métabolisme mitochondrial, préparant ainsi sa vie prochaine dans l'insecte vecteur (Opperdoes, 1987). Ces programmes de différenciation permettent donc aux parasites de survivre à différentes conditions, et pourraient être assimilés à un mécanisme d'adaptation pour la survie et la transmission.

Chez les Apicomplexa, on peut trouver des cas où les parasites se multiplient indéfiniment de génération en génération sous une forme identique, dépendant visiblement d'un signal extérieur pour s'engager vers une autre voie. La gamétogénèse chez les *Plasmodium* et la différenciation en bradyzoïte chez *Toxoplasma gondii* suivent ce cheminement. La multiplication indéfinie d'un stade permettrait au parasite d'assurer son maintien, la différenciation vers un autre stade pourrait lui permettre de progresser dans le cycle (gamétogénèse) ou de donner naissance à des stades quiescents (regroupés dans des structures kystiques) destinés à attendre soit un changement d'hôte (kystes des Sarcocystidés), soit des conditions immunologiques plus favorables (hypnozoïtes des *Plasmodium*). Au contraire chez *Eimeria*, chacune des générations schizogoniques qui se succèdent dans les cellules intestinales de l'hôte génère des mérozoïtes de taille et de forme distinctes et doit obligatoirement intervenir avant la phase sexuée. La gamétogénèse de *Toxoplasma gondii* qui a lieu dans l'intestin du chat obéit à ce même processus de différenciation coordonnée et programmée. Dans ces 2 cas précis, la différenciation semble suivre un schéma directement inscrit dans le génome du parasite et se dérouler indépendamment de facteurs extérieurs: quelles que soient les circonstances, le parasite est programmé pour évoluer vers un stade bien défini.

Il existe donc chez les parasites un grande diversité de programmes de différenciation dont les causes et les mécanismes sont extrêmement variés: certains dépendent d'événements extérieurs, d'autres sont génétiquement programmés dans le parasite. Leur régulation à l'échelle moléculaire est souvent mal connue. La différenciation tachyzoïte – bradyzoïte chez *Toxoplasma gondii* semble être un modèle relativement facile à étudier expérimentalement, et permettrait donc d'apporter des élements de réponse à la compréhension du mécanisme de différenciation parasitaire en général.

L'étude de la conversion de stade chez *Toxoplasma gondii* a connu un regain

d'intérêt depuis la recrudescence de la toxoplasmose chez les sidéens, qui est devenue une des pathologies opportunistes majeures au cours du SIDA. Chez l'hôte immunocompétent, la multiplication de la forme proliférative tachyzoïte responsable de l'infection aigue est jugulée par la mise en place de la réponse immune. Le parasite développe alors une phase chronique caractérisée par l'enkystement sous forme bradyzoïte, forme quiescente, dans certains tissus comme le cerveau et les muscles. En cas de déficience immunitaire, les bradyzoïtes sont capables de réinitier la multiplication sous forme tachyzoïte, qui prolifère rapidement et qui est responsable de foyers de nécroses dont l'issue est parfois fatale. Les mécanismes qui gouvernent l'enkystement (amenant le tachyzoïte à se convertir en bradyzoïtes) et ceux responsables de la réactivation (éclatement des kystes et retour possible des bradyzoïtes vers la forme tachyzoïte) sont mal connus. L'immunocompétence empêche le retour au stade prolifératif tachyzoïte et semble contenir l'infection sous une forme chronique qui n'a pas de conséquences pathologiques. La réactivation de la toxoplasmose comporte deux composantes, l'une conduisant à une dérépression de l'état de quiescence des kystes qui amène la libération des bradyzoïtes, l'autre responsable de la conversion vers le stade tachyzoïte. Les travaux réalisés *in vivo* ont mis en évidence le rôle important de l'interféron gamma dans la prévention de l'éclatement des kystes et donc dans le contrôle de l'infection chronique (Suzuki *et al*, 1988). Une immunodépression chez une souris infectée provoque une réactivation avec apparition de foyers de nécrose, des foyers de tachyzoïtes, ainsi qu'une augmentation du nombre de kystes (Gazzinelli *et al*, 1992); la capacité à former des kystes est donc préservée dans ces conditions, rendant difficile l'interprétation de l'intervention de l'immunité dans le phénomène. Les études menées *in vitro*, ont montré que la formation de bradyzoïtes pouvait intervenir en absence de facteurs immunologiques. L'étude de l'interconversion de stade a donc pu être réalisée *in vitro* permettant de se libérer de la complexité de la réponse immune de l'hôte.

Les travaux concernant la différenciation se sont multipliés récemment car des sondes monoclonales spécifiques de stade ont été obtenues depuis peu (Tomavo *et al*; 1991, Bohne *et al*; 1993, Weiss *et al*; 1992). Auparavant, la difficulté à obtenir des bradyzoïtes en quantité compatible avec l'analyse limitait les investigations sur le sujet. Jusqu'aux travaux réalisés ici, il n'existait pas de systèmes permettant la production

de bradyzoïtes *in vitro*, les kystes isolés à partir de cerveau d'animaux infectés, obtenus en quantité réduite étaient la seule source de production disponible. La connaissance des tachyzoïtes était par contre plus avancée, ce stade proliférant très facilement en culture de cellules.

Notre travail a donc consisté à étudier la différenciation tachyzoïte – bradyzoïte *in vitro*. Nous avons d'abord analysé celle se déroulant spontanément, comme cela avait déjà été décrit auparavant par certains auteurs (Jones *et al*; 1986, Dardé *et al*; 1989) qui, ne disposant pas de sondes spécifiques de stade, utilisaient les critères morphologiques pour différencier les stades. Nous avons ensuite essayé d'induire la différenciation vers le stade bradyzoïte en utilisant divers facteurs pouvant en fait, mimer les conditions rencontrées par les parasites intracellulaires dans l'hôte immunocompétent afin d'apporter des éléments nouveaux dans la compréhension du mécanisme déclencheur de la différenciation. La possibilité d'induire la formation de bradyzoïtes *in vitro* en grande quantité, a permis par ailleurs la caractérisation moléculaire d'une protéine spécifique du stade bradyzoïte, en vue de l'étude ultérieure de la régulation de la différenciation à l'échelle moléculaire.

MATERIELS
et
METHODES

I. MATERIELS

I-1. La culture cellulaire

Des fibroblastes humains (HFF: Human Foreskin Fibroblasts) et des cellules Véro (singe vert africain) sont utilisés comme cellules hôtes pour les parasites. La culture en monocouches des cellules est réalisée dans des flacons en matière plastique pour l'entretien ou dans des chambres de culture à 4 ou 24 puits pour les expérimentations. Le milieu de culture généralement utilisé est le DMEM complémenté de glutamine (4 mM), d'antibiotiques (Pénicilline 50 U/ml - Streptomycine 50 μg/ml)et de 5% de sérum de veau foetal pour les cellules Véro ou de 10% pour les fibroblastes humains (ramené à 5% lors des expérimentations). Les cultures sont placées dans une étuve à 37°C et en atmosphère contenant 5% de CO_2.

I-2. Les parasites

I-2.1. Les souches de Toxoplasmes

4 souches réputées peu virulentes entrainant une infection chronique chez la souris (formation de kystes) ont été utilisées: souche 76K (isolée chez le cobaye, Laugier and Quilici, 1970), souche BQNC2 isolée chez l'homme (Fortier, non publié), souche Prugniaud (Martrou et al, 1965), et la souche PLK (Llyod Kasper).

La souche virulente RH isolée chez l'homme (Sabin and Feldman, 1946), responsable d'une infection aiguë léthale chez la souris a également été utilisée.

I-2.2. L'entretien des souches

L'entretien *in vivo* des tachyzoïtes est assuré par des passages intrapéritonéaux chez des souris Swiss, tous les 3 jours. Les parasites sont récupérés par un lavage de la cavité péritonéale avec du milieu de culture DMEM.

L'entretien *in vitro* des tachyzoïtes est réalisé sur des cellules Véro en monocouches cellulaires.

L'entretien sous forme chronique s'effectue tous les deux mois chez des souris Swiss, CBA, ou 129 OLA, infestées par voie orale. Les kystes sont isolés à partir du cerveau selon la méthode de Cornelissen *et al* (1981): le cerveau prélevé est broyé dans un homogénéiseur de Potter - Elvegehm dans 4 ml de tampon PBS (Phosphate buffered saline: tampon phosphate 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4). L'homogénat est centrifugé à 1000 rpm pendant 5 minutes. Le culot est repris par 7,5 ml de PBS et 2,5 ml de Percoll isotonique (90% de Percoll (Pharmacia) + 10% de Nacl 1,5 M). La suspension est centrifugée 15 minutes à 2000 rpm. Le culot obtenu qui contient les kystes contaminés par quelques cellules et des hématies est lavé 2 fois par du PBS.

I-2.3. Purification des parasites intracellulaires

Les cellules infectées et cultivées dans des boîtes de culture de 25 cm^2 (Falcon) sont décollées par raclage à l'aide d'un grattoir de caoutchouc et resuspendues dans du milieu de culture contenant du SVF. Les parasites sont libérés des cellules après passage de la suspension dans un homogénéiseur de Dounce, et sont débarrassés des débris cellulaires par filtration sur colonne de fibres de verre selon la méthode décrite par Grimwood *et al* (1979).

I-2.4. La production d'oocystes

Les oocystes sont récupérés dans les fécès de jeunes chatons infestés 3 à 4 jours auparavant par des kystes de la souche 76K prélevés dans le cerveau de souris infectées. Les oocystes sont récupérés à l'état non sporulé. Un milieu richement oxygéné est exigé pour une bonne sporulation qui aboutira à la formation de sporozoïtes infectieux. La suspension fécale est homogénéisée dans du bichromate de potassium 2% par brassage mécanique, et ensuite filtrée à travers un tamis à maille large (0,75 mm), puis plus fine (0,3 mm) pour en éliminer les gros débris. Après centrifugation à 300 g pendant 10 minutes, les oocystes sont resuspendus dans le bichromate de potassium 2%. La suspension est agitée et aérée par un courant d'air comprimé pendant 72 heures à la température ambiante.

La suspension d'oocystes sporulés est lavée deux fois par l'eau distillée. Après

centrifugation, les oocystes sont resuspendus dans une solution de sucrose 1,15 M et centrifugés à 650 g pendant 15 minutes. Les oocystes se retrouvent à la surface et sont recueillis par aspiration et lavés par l'eau distillée. Il peuvent être conservés à 4°C dans le bichromate de potassium. Les oocystes sont centrifugés dans de l'eau de Javel à 12%., ce qui entraîne leur flottation. Ils sont ensuite lavés plusieurs fois par du milieu de culture DMEM afin d'éliminer les traces d'hypochlorite. La suspension est ensuite homogénéisée dans un broyer de Potter afin d'ouvrir les oocytes et de libérer les sporocystes. Ces derniers sont centrifugés 5 minutes à 500 g et sont incubés 10 minutes à 37°C dans le milieu d'excystation composé de trypsine à 0.25%, de taurocholate de sodium à 0,75% dans du milieu DMEM. Les sporozoïtes libérés sont centrifugés 2 fois dans le milieu de culture à 500 g, et sont prêts pour l'infection de cellules.

I-3. Les anticorps monoclonaux

I-3.1. Les spécificités antigéniques

Nous avons utilisé 4 anticorps monoclonaux T8 4A12, 2C2, 3B1 et 4G10 respectivement dirigés contre des protéines membranaires P36, 34, 18, et 21 spécifiques du bradyzoïte (Tomavo *et al*, 1991). L'anticorps monoclonal T4 1E5 (Couvreur *et al* 1988) qui reconnaît la protéine majeure de surface SAG1 a servi de marqueur spécifique des tachyzoïtes.

I-3.2. Purification et biotinylation de l'anticorps T4 1E5

– *Purification des immunoglobulines* (technique de Saint – Blancard *et al*, 1982)

3 ml d'ascite sont dessalés sur une colonne de gel filtration GFO5. L'élution est réalisée en tampon Tris/HCl 25 mM, NaCl 35 mM à pH 8,8. Le premier pic d'adsorption à 280 nm qui contient les protéines est passé sur une colonne échangeuse d'ions DEAE Trisacryl. L'élution est réalisée en tampon Tris/HCl 25 mM, NaCl 35 mM à pH 8,8 suivi du passage d'un tampon Tris/HCl 25 mM, NaCl 75 mM pH 8,5. Une électrophorèse SDS Page (Laemmli, 1970) est réalisée sur chaque pic élué afin de vérifier la pureté des immunoglobulines. L'éluat est dialysé et concentré contre du PBS dans une cuve Microprodicon (Bioblock) sous vide, une nuit à 4°C.

- *Biotinylation*

10 mg de protéines purifiées à biotinyler, sont reprises par 10 ml de tampon de couplage (tampon bicarbonate de sodium 0,2 M pH 8,8 contenant NaCl 0,15 M). 200 μl d'une solution de biotine activée (N – Hydroxysuccinimide biotine, IBF) à 4 mg/ml dans de la N - dimethylformamide sont ajoutés. Le mélange est incubé 10 minutes à 20°C sous agitation douce. La réaction est arrêtée par addition de 100 μl de NH4Cl 1 M pH 6,0. La protéine biotinylée est rapidement dialysée et concentrée contre du PBS.

II. METHODES

II.1. Immunofluorescence indirecte

Nous avons utilisé une technique de double marquage utilisant successivement un anticorps monoclonal révélé par un conjugué anti - immunoglobulines de souris couplé à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC, Tago), puis un second anticorps monoclonal biotinylé révélé par la streptavidine Texas - Red (Boehringer - Mannheim). Cette technique permet de détecter sur la même préparation des protéines spécifiques de bradyzoïtes et de tachyzoïtes.

Les monocouches de cellules parasitées sont cultivées sur des lamelles de verre de 12 mm de diamètre, plaçées dans des chambres de culture à 4 puits (Nunclon). Les cellules, après un lavage en PBS, sont fixées par une solution de paraformaldéhyde à 2% en PBS. Les cellules sont perméabilisées par 3 bains successifs d'acétone: un bain dans l'acétone 50% à 4°C, un bain d'acétone 100% à - 20°C, et un bain d'acétone 50% à 4°C. Les cellules fixées sont incubées pendant 10 minutes dans du PBS contenant 10% de SVF, tous les anticorps utilisés sont dilués dans du PBS contenant 2% de SVF. Les cellules sont ensuite incubées avec l'AcMc spécifique du bradyzoïte (T8 4A12, ou T8 2C2, ou T8 3B1, ou T8 2C2) dilué au 1/100 pendant 30 minutes, puis lavées 3 fois en PBS, et incubées 30 minutes avec le conjugué anti - immunoglobulines de souris couplé à l'IFTC, à l'obscurité. Dans une seconde étape, les cellules sont incubées 30 minutes avec l'AcMc T4 1E5 (anti SAG1) biotinylé, dilué au 1/400e et lavées 3 fois en PBS, puis incubées 30 minutes avec la Streptavidine Texas - Red. Après lavage en PBS, les lamelles sont montées en Mowiol. Les observations sont réalisées sur un microscope Zeiss Axiophot équipé pour l'épifluorescence.

II-2. Microscopie électronique

II-2.1. Etude ultrastructurale

Les cellules sont cultivées et infestées dans des plaques de polyéthylène à cupules de 3 cm de diamètre (Costar). Les cellules sont fixées par une

solution de glutaraldéhyde à 2,5% en tampon Cacodylate 0,1 M pH 7,4. Les cellules sont ensuite post – fixées pendant une heure à température ambiante par le tétraoxyde d'osmium en solution à 1% dans le même tampon. Elles sont deshydratées par une série de bains d'alcool de concentration croissante (alcool 70°: 10 mn, alcool 95°: 15 mn, alcool 100°C: 3 fois 20 mn). L'oxyde de propylène permet de décoller le tapis cellulaire qui est récupéré et centrifugé à 10 000g pendant 10 mn. Le culot est incubé 20 mn dans un nouveau bain d'oxyde de propylène, puis une heure dans un mélange (volume /volume) d'oxyde de propylène / Epon, et finalement 15 heures dans de l'Epon. L'inclusion complète en Epon s'effectue à 60°C pendant 72 heures.
Les coupes fines sont réalisées sur l'ultramicrotome ULTRACUT (Reichert) au couteau de diamant et récupérées sur des grilles membranées. Elles sont colorées 2 mn à l'obscurité par l'acétate d'uranyle (2% dans de l'alcool à 50°), rinçées à l'eau distillée et contrastées par du citrate de plomb (réactif de Reynolds) pendant 2 mn, à l'abri du CO2. Après lavage à l'eau distillée et séchage, les grilles sont observées au microscope électronique HITACHI H600.

II–2.2. Immunolocalisation ultrastructurale

– Préparation des échantillons

Les cellules cultivées comme précedemment (chambre de culture Costar) sont fixées par un mélange paraformaldéhyde 4%, glutaraldéhyde 0,05% en tampon PIPES (Sigma) 0,15M pH 7,00, pendant 30 mn à température ambiante puis une heure à 4°C. La monocouche de cellules infectées est lavée par du PBS contenant 10% SVF, puis est décollée par un grattoir de téflon. La suspension est centrifugée 5 mn à 10000 g dans des microtubes Eppendorf. Le culot cellulaire est récupéré et incubé dans une solution de sucrose 2,3 M – PVP 10% (Polyvinylpyrolidone 10 000, Sigma) pendant 12 heures. La congélation est réalisée par immersion rapide dans l'azote liquide du culot monté au préalable sur un porte – objets métallique. Les coupes réalisées sur un ultracryotome EC4 Reichert à – 95 °C, sont récupérées sur des grilles de nickel recouvertes de formvar, dans du PBS contenant 10% de SVF.

– *Immunodétection*

Dans une première étape, les grilles sont incubées sur des gouttes contenant l'AcMc dilué au 1/50e en PBS / SVF pendant une heure. Les grilles sont ensuite lavées 5 fois en PBS, et transférées sur une solution d'anticorps de lapin anti – souris. Après 5 lavage en PBS, les grilles sont incubées une heure dans la solution de protéine A couplée à l'or colloïdal 8 nm. Les grilles sont lavées au PBS, puis à l'eau distillée et incluses dans un mélange (9V/1V) methylcellulose / acetate d'uranyle 4%, pendant 10 mn à l'obscurité. Les grilles sont séchées par élimination de l'excès de methylcellulose / acétate d'uranyle. Les grillées sont examinées au microscope électronique HITACHI H600.

II–3. Marquages métaboliques

Des cultures infectées et placées dans le milieu pH8 pendant 3 jours sont marquées métaboliquement par l'Isoleucine tritiée (250μcurie par boite de culture de 25 cm^2) pendant 12 heures ou par la glucosamine tritiée. Le marquage se fait dans un milieu pH8 dépourvu d'isoleucine ou de glucose, supplémenté par du SVF utilisé dialysé. Les cellules sont ensuite lysées et subissent une immunoprécipitation avec divers immunoadsorbants comme décrit ci – dessous.

II–4. Biotinylation des molécules de surface

La biotine utilisée est la sulfo–NHS–biotin (Pierce), elle est stockée dans du DMSO (Dimethylsulfoxyde) à 50 mg / ml. Les parasites purifiés sont incubés en présence de 50 μg de biotine en tampon PBS, pendant 10 minutes à température ambiante. Les parasites sont ensuite lavés en PBS.

II–5. Techniques immunochimiques

II–5.1. Préparation de l'immunoadsorbant T8 3B1

10 mg d'AcMc purifié (voir I–3.2) repris dans 5 ml de tampon bicarbonate, sont mis en contact avec 300 mg de gel sépharose 4B activé par le bromure de cyanogène (Pharmacia), préalablement gonflé dans une solution 1 mM HCl et lavé par du tampon bicarbonate. La suspension est mise en

agitation rotative pendant 2 heures à température ambiante ou une nuit à 4°C. L'excès de protéines non couplées est éliminé par un lavage dans du tampon 100 mM Tris/HCl pH 8,00, puis les sites actifs libres du gel sont hydrolysés par ce même tampon à température ambiante pendant 2 heures. Le gel subit ensuite 3 lavages alternés dans un tampon acétate de sodium 0,1 M à pH 4,00 contenant 0,5 M NaCl et dans le tampon bicarbonate de couplage. Après lavage dans du PBS, l'immunoadsorbant ainsi préparé est dilué au 1/5ème dans du PBS.

II-5.2. Immunoprécipitation de la protéine P18 par l'immunoadsorbant T8 3B1

a) Solubilisation des cellules

Les cellules infectées sont lysées par un tampon PBS contenant 1% de NP40, 2 mM d'EDTA, 0,01 mg/ml de leupeptine, 0,1 mg/ml d'aprotinine et 1 mM de PMSF, à raison de 1 ml par flacon de culture de 25 cm^2. La suspension subit une agitation rotative pendant 2 heures à température ambiante, et est centrifugée 30 mn à 10 000g. Le surnageant est conservé pour l'immunoprécipitation.

b) Immunoprécipitation en vue de l'analyse de protéines marquées

Le lysat détergent de la culture parasitaire est incubé avec l'immunoadsorbant (20 μl de gel) pendant 2 heures à température ambiante sous agitation rotative. Le gel est lavé 5 fois 10 mn dans un tampon Tris/HCl 50 mM pH 8,3 contenant 0,5% de NP40 et 1M de NaCl, par centrifugation à basse vitesse, puis une fois par un tampon Tris/HCl 5 mM pH 6,8. L'élution des protéines est opérée par chauffage du gel repris par du tampon de reprise pour electrophorèse (Tris/HCl 62,5 mM, SDS 2%, saccharose 10%, bleu de Bromophénol 0,2%) pendant 10 mn à 95°C. Les protéines éluées sont analysées en électrophorèse SDS Page.

c) Immunoprécipitation en vue de la purification de la P18

Le lysat de la culture parasitaire est passé sur une colonne montée avec l'immunoadsorbant T8 3B1, préalablement équilibrée par un tampon Tris/HCl 50 mM pH 8,3, NaCl 150 mM, NP40 0,5%, EDTA 2 mM, pendant 24 heures avec recyclage. La colonne est lavée successivement par 300 ml de tampon

Tris /HCl 50 mM pH 8,3, NaCl 1M, NP40 0,5%, puis par 50 ml du même tampon sans NaCl et enfin par 50 ml de tampon Tris - HCl 50 mM pH 8,3, Désoxycholate de Na (DOC) 0,5%. Ce dernier lavage est terminé à température ambiante et la colonne est éluée par 25 ml de tampon d'élution contenant du Diéthylamine /HCl 0,1 M pH 11,5 et du DOC 0,1%. Les éluats sont directement dialysés et concentrés dans un concentrateur centricon (Bioblock).

II-6. Techniques électrophorétiques

II-6.1.Electrophorèse en gel d'acrylamide - SDS (SDS - PAGE)

L'analyse électrophorétique des protéines est effectuée selon la technique décrite par Laemmli (1970). Un gel de séparation de 15% en acrylamide dans un tampon Tris - HCl 375 mM pH 8,8 contenant 0,1% de SDS, préparé à partir d'une solution mère à 30% d'acrylamide et 0,8% de bisacrylamide, est coulé entre 2 plaques de verre (grands gels 16 X 16 cm) ou entre une plaque de verre et une plaque d'alumine (mini gels 8 X 6 cm). Le gel de concentration de 5% en acrylamide est préparé dans un tampon Tris - HCl 125 mM pH 6,8 contenant 0,1% de SDS. Les échantillons sont repris dans un tampon Tris/HCl 62,5 mM avec 2% de SDS, 10% de saccharose, 0,2% de Bleu de Bromophénol contenant ou non du dithiothréitol, selon les cas. Les échantillons sont dénaturés par chauffage à 95°C pendant 5 minutes. L'électrophorèse est réalisée en courant constant à 30 mA pendant 2 heures pour les grands gels et pendant 30 minutes pour les mini gels.
Le gel est calibré à l'aide de marqueurs de poids moléculaire (LMW kit: Low Molecular Weight, Pharmacia).

II-6.2. Détection des protéines par coloration au nitrate d'argent

Après électrophorèse, les protéines sont visualisées par une coloration du gel au nitrate d'argent selon la méthode de Morrissey (1981). Les protéines sont préfixées par une solution de Méthanol 50%, acide acétique 10% pendant 30 minutes, puis par un mélange Méthanol 5%, et acide acétique 7%, 30 minutes. Les protéines sont ensuite fixées par du glutaraldéhyde à 10% (Em

Science, Biological Grade) 30 minutes. Le gel est lavé abondamment à l'eau distillée 2 à 3 heures. Le gel est traité par du dithiothréitol (DTT) à 5 μg/ml 30 minutes, puis par une solution de nitrate d'argent à 0,1% sous agitation pendant 30 minutes. Après un rapide lavage à l'eau distillée, le gel est coloré par une solution de carbonate de sodium à 3% contenant 0,018% de formaldéhyde. La coloration est arrêtée par l'acide citrique 2,3M, et le gel est lavé plusieurs fois à l'eau avant d'être séché.

II-6.3. Détection des protéines marquées par autoradiographie

La détection des protéines radiomarquées à l'Isoleucine tritiée ou à la Glucosamine tritiée et immunoprécipitées par un immunoadsorbant est réalisée après séparation électrophorétique sur gel. Le gel est coloré au Bleu de Coomassie (Merck) 0,02% dans une solution contenant 10% d'acide acétique et 25% d'isopropanol, puis est décoloré par l'acide acétique à 10%. Le gel est ensuite traité pendant une heure, par un agent scintillant (Enhance, NEN) destiné à amplifier sous forme de photons la radioactivité émise. L'agent scintillant est précipité par 3 lavages à l'eau de 10 minutes chacun. Le gel est ensuite séché sous vide sur du papier Whatman n°3, et exposé à un film X-OMAT AR Kodak à - 70°C.

II-6.4. Electrotransfert et immunoempreinte (Westernblot)

Après électrophorèse SDS - PAGE,les protéines sont transférées du gel sur une membrane de nitrocellulose (Céra-labo) à l'aide d'un appareil de transfert semi - sec (LBK) selon la méthode de Towbin *et al* (1978). Le gel de séparation est placé sur une membrane de nitrocellulose et l'ensemble est inséré entre deux séries de feuilles de papier Watman n°3, préalablement imbibées par un tampon de transfert (Tris 48 mM, Glycine 39 mM, SDS 0,0375%, méthanol 20%). Le transfert est réalisé sous ampérage constant (0,8 mA/cm^2) pendant une heure. La membrane de nitrocellulose est ensuite colorée 10 minutes par une solution de Rouge Ponceau 0,2% dans 3% d'acide trichloracétique, puis est rincée à l'eau distillée.

La détection de protéines spécifiques transférées s'effectue par

révélation immunochimique. La feuille de nitrocellulose est découpée en bandelettes, celles - ci sont incubées 30 minutes dans un tampon TNT (Tris/HCl 15 mM pH8; NaCl 0,14 M; Tween 20 0,05%) contenant 5% de lait en poudre (Gloria) afin de saturer les sites d'adsorption non spécifiques sur la nitrocellulose. Les bandelettes sont incubées une heure avec les anticorps monoclonaux dilués dans le TNT à température ambiante. Après 3 lavages de 10 minutes dans le TNT, les bandelelettes sont incubées une heure en présence du conjugué anti - immunoglobulines de souris couplé à la phosphatase alcaline, dilué au 1/7500e dans le TNT. Après 5 lavages de 5 minutes en TNT, la phosphatase alcaline est révélée à l'obscurité en présence de BCIP (Bromo - Chloro - Indolyl - Phosphate) et de NBT (Nitro - Bleu - Tétrazolium). La réaction est arrêtée par un lavage à l'eau distillée.

Les protéines biotinylées sont détectées par incubation de la nitrocellulose avec de la streptavidine peroxydase (AMERSHAM) dilué au 1/2500 en TNT pendant une heure, et révélées avec de la diaminobenzidine - H2O2 à 1%.

II-7. Microséquençage de la P18

Le microséquençage de la P18 a été réalisé dans le laboratoire de Microbiologie de l'Université de Gand en collaboration avec le Professeur Jos Van Beeumen et Monsieur Bart Samyn.

II-7.1. Séquençage N terminal de la P18.

La P18 est purifiée à partir de culture infectée plaçée à pH 8, par immunoaffinité (Rf: II-3.2.b). L'éluat concentré est repris par du tampon de reprise et est séparé par électrophorèse SDS Page (gel d'acrylamide à 15% de 1,5 mm d'épaisseur). Les protéines du gel sont transférées sur une membrane de Polyvinylènedifluoride (PVDF, Applied Biosystem). Le transfert est effectué en tampon Tris 50 mM Borate 50 mM pH 8,6 pendant 18 heures à 25 volts. La membrane de PVDF est ensuite colorée (Bleu de Coomassie 0,01%, acide acétique 5%, méthanol 35%), et séchée à l'air.
La bande correspondant à la P18 est découpée et plaçée directement dans un séquenceur automatique (type 476 A, Applied Biosystem). Les phenylthio -

hydantoïne acides aminés, obtenus selon la dégradation d'Edman (1956) sont analysés par chromatographie liquide à haute pression (HPLC) qui est couplée au séquenceur.

II-7.2. Analyse de la composition en acides aminés et séquençage d'un fragment interne de la P18.

La composition de la P18 est réalisée sur la protéine purifiée par immunoaffinité comme précédemment. La protéine subit une hydrolyse acide: HCl 6 N, pendant 90 mn à 150°C. Le tryptophane et la cystéine sont détruits au cours de l'hydrolyse. Puis une digestion par une Lysine C endoprotéinase est réalisée sur la P18, celle ci étant riche en lysine. Après extraction, les peptides obtenus sont séparés sur une colonne C8 par chromatographie liquide phase reverse (RPLC, SMART system, Pharmacia). Le microséquençage des peptides est réalisé selon la méthode de dégradation d'Edman comme décrit ci dessus.

III. AMPLIFICATION et CLONAGE d'un fragment de gène codant pour la protéine P18

III.1. Préparation de l'ADN génomique de *Toxoplasma gondii*

Un culot d'environ $1,5.10^9$ parasites purifiés (souche pK) est resuspendu dans 10 ml de tampon d'extraction (Tris 0,1M pH 8; EDTA 0,05 M; NaCl 0,3 M; SDS 1%) contenant de la Protéinase K à 20 μg/ml, pendant 3 heures à 50°C sous agitation. Après une extraction des protéines au phénol/chloroforme, l'ADN présent dans la phase aqueuse est précipité par l'acétate de sodium 3 M pH 6 ($1/10^e$ du volume) et l'éthanol absolu (2 volumes) et conservé à -20°C. L'ADN récupéré à l'aide d'une baguette de verre est lavé par de l'éthanol 70°, puis est redissout dans du tampon TE (Tris/HCl 10 mM pH 7,5; EDTA 1 mM).

La concentration de l'ADN est déterminée par mesure au spectrophotomètre de la Densité Optique à 260 nm, une unité de DO équivalant à 50 μg/ml.

III.2. Réaction d'amplification en chaine (PCR)

III.2.1. Préparation des amorces de PCR

Les oligonucléotides de synthèse ont été réalisés par la Société Eurogentec.

- L'amorce 5' est déduite de la séquence protéique N terminale de la P18.
- L'amorce 3' correspond à la séquence nucléotidique inverse et complémentaire de la séquence déduite d'un fragment interne de la P18.
- Des oligonucléotides plus internes ont également été utilisés. Tous les oligonucléotides synthétisés sont dégénérés.

* primer 5' (n°1): 5'-C-CCC-GAA-TTC-CTG-GAC-NTA-YGA-YTT-YAA- 3'
* primer 3' (n°1): 5'-GCI-GCY-TRY-TCN-ACN-GGY-TCR-TC- 3'

* primer 5' interne (n°2): 5'-GAR-ATN-ATN-ACI-CCI-GG- 3'
* primer 3' interne (n°2): 5' -GGI-GGD-ATR-TAY-TCI-ARI-GG- 3'

I pour Inosine, N pour base purique, Y pour base pyrimidique, et R pour les 4 bases.

III.2.2. Réaction d'amplification

Les réactions sont réalisées avec 100 pM de chaque amorce (primer 5' n°1 et primer 3'n°1) 100 ng de DNA, des dinucléotides tri phosphate (Boehringer Mannheim), du tampon 10X, du Magnésium, et de la Taq Polymerase (Goldstar). L'amplification est effectuée sur un appareil automatique. Le programme est constitué de 3 cycles différents. Après une étape de 5 minutes à 95°C, le premier cycle, répété 5 fois consiste en une dénaturation d'1 minute à 95°C, 1 minute à 50°C (température d'hybridation des amorces), 1 minute à 72°C (température permettant l'extension). Le deuxième, répété 5 fois, est constitué d'1 minute à 95°C, 1 minute à 45°C, et 1 minute à 72°C. Le troisième, répété 25 fois est constitué de 1 minute à 95°C, 1 minute à 40°C, et 1 minute à 72°C. Le programme se termine par 5 minute à 72°C. La stratégie utilisant des températures d'hybridations dégressives a été adoptée en raison de la nature des amorces composées d'oligonucléotides dégénérés. En diminuant progressivement la température, on augmente la probabilité qu'une amorce se fixe.

Les amorces internes 5' et 3' (n°2) sont utilisées pour tenter de réamplifier le fragment amplifié lors de la première PCR.

III.2.3. Analyse du fragment amplifié

L'analyse électrophorétique des fragments amplifiés est réalisé en gel d'agarose. Le gel est préparé en tampon TBE (Tris 90 mM, Borate 90 mM, EDTA 2 mM) contenant 0,5 μg/ml de bromure d'éthidium (Sigma). Les échantillons sont déposés avec une solution contenant 50% de glycérol, et du bleu de bromophénol dans l'eau. La séparation électrophorétique est réalisée en courant constant à 50 mA pendant 2 heures. Les bandes d'ADN amplifié sont visualisées sous U.V. grâce à la fluorescence du bromure d'éthidium intercalé. Des marqueurs de poids moléculaires (Boehringer) sont déposés en parallèle.

III.3. Clonage du fragment amplifié

III.3.1. Préparation du fragment amplifié

Une électrophorèse préparative en gel de 2% d'agarose en tampon TAE (Tris 40 mM, Acétate 40 mM pH 8, EDTA 1 mM) est réalisée, la bande correspondant à l'ADN amplifié est excisée. L'ADN est ensuite élué du gel à l'aide du kit "Qiaex" (Qiagen). L'ADN est repris en tampon TE.

III.3.2. Insertion dans un vecteur plasmidique

Le clonage du produit de PCR est réalisé dans le plasmide pCR-ScriptTM SK(+) provenant du kit développé par Stratagène, selon la technique de Bauer (1992). Le kit contient le vecteur prédigéré (10ng/μl), la T4 ligase (4U/μl), l'enzyme de restriction Srf I (5U/μl) et les tampons. Le plasmide porte le gène de résistance à l'ampicilline et l'opéron lactose.
50 ng de vecteur pCR-Script, 150 ng d'ADN amplifié, 4 unités de T4 ligase, et 10 unités d'enzyme Srf I sont incubés une heure à température ambiante. Le mélange est ensuite chauffé pendant 10 minutes à 65°C afin d'inactiver les enzymes, et est conservé à 4°C jusqu'à l'étape de transformation.

III.3.3. Transformation des bactéries compétentes

Les bactéries compétentes *Epicurian Coli* XL1 - Blue MRF kan^r, fournies avec le vecteur, sont mises en contact avec 25 mM de béta-mercaptoéthanol pendant 10 minutes sur la glace. 10 ng d'ADN issu de la ligation dans le vecteur (Rf: IV.3.2.) sont ajoutés, et le mélange est incubé 30 minutes sur la glace. Les bactéries subissent alors un choc thermique à 42°C pendant 45 secondes. Les bactéries ainsi traitées sont incubées 1 heures sous agitation à 37°C en milieu SOC (20 g/l Tryptone, 5g/l extrait de levure, 0,5 g/l NaCl, 2 g/l MgCl2, 1,2 g/l MgSO4, 3,6 g/l glucose) afin de permettre l'expression de la résistance à l'antibiotique du plasmide. La suspension bactérienne est étalée sur le milieu LB agar (10 g/l tryptone, 5 g/l extrait de levure, 10 g/l NaCl, 20 g/l Bactoagar à pH 7), contenant 20 μg/ml d'ampicilline, 40 μl d'IPTG 100 mM et 20 μl de XGal 20 mg/ml, et est incubée une nuit à 37°C. Seules les bactéries renfermant un plasmide pourront se développer en présence d'ampicilline.

III.3.4. Recherche des bactéries transformées

Le fragment d'ADN est inséré au niveau du site Srf I situé dans l'opéron lactose, rendant ainsi non fonctionnelle la béta-galactosidase. En présence d'un inducteur de l'opéron lactose (IPTG), les bactéries transformées avec le plasmide portant l'insert sont incapables d'exprimer la béta-galactosidase et donc de métaboliser le substrat coloré de cette enzyme. Les colonies ainsi obtenues sont d'apparence blanche, les bactéries transformées avec le plasmide sans insert sont de couleur bleue.

Les colonies blanches, renfermant l'insert sont repiquées stérilement et cultivées en milieu LB liquide contenant l'ampicilline. Le plasmide est ensuite extrait (QUIAGEN). La présence de l'insert est controlé par PCR sur le plasmide purifié.

III.4. Séquençage du fragment amplifié

Le plasmide renfermant l'insert à séquencer est dénaturé en simple brin par NaOH 2M pendant 10 minutes à température ambiante et déposé au sommet d'une la colonne Sépharose CL-4B (Pharmacia) préalablement équilibrée par 2 volumes de tampon TE, puis séchée par centrifugation à 1000 g pendant 2 minutes. Le plasmide est séparé de la soude par centrifugation de la colonne à 1000 g, 2 minutes et l'éluat récupéré est soumis à une réaction de séquence.

La technique de séquençage selon la méthode de Sanger (1977) est réalisée avec le kit Sequenase^{R} version 2.0 (USB) contenant les tampons de réaction, l'ADN polymerase du phage T7, les nucléotides froids et la solution d'arrêt. Le principe de la méthode est basé sur la capacité des ADN polymérases d'allonger une amorce hybridée sur l'ADN à séquencer et l'arrêt de cette synthèse lorsqu'un didéoxynucléotide est incorporé. Les promoteurs T3 et T7 (USB) s'hybridant respectivement sur le brin codant et non codant du vecteur, utilisés comme amorce permettent le séquencage des deux brins de l'insert.

Une réaction de séquence est réalisée pour chaque amorce, qui est hybridée au plasmide dénaturé pendant 2 minutes à 65°C. Lorsque la température est

descendue à 35°C, les nucléotides (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) à 0,5 mM, du DTT 0,1 M, 0,5 μCi d'ATP S^{35} sont ajoutés. La réaction de synthèse est initiée lors de l'addition de l'ADN polymerase T7 au mélange. Après 5 minutes d'incubation à température ambiante, le mélange est transféré dans 4 tubes renfermant chacun un didéoxynucléotide (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) à 2 mM et est laissé en contact 5 minutes à 37°C. La réaction est arrêtée par la solution d'arrêt.

Un gel dénaturant est préparé à partir d'une solution d'Hydrolink™ Long Ranger™ diluée à 5% (Bioprobe system) dans du tampon TBE 1,2X (Tris/Borate 108 mM pH 8, EDTA 2,4 mM) contenant 420 g/l d'urée et coulé entre deux plaques de verre.

Les 4 tubes de réaction sont chauffés à 90°C 5 minutes puis leur contenu est déposé dans 4 puits. La migration s'effectue en tampon TBE 0,6X à 55 Watts. Deux dépôts successifs décalés dans le temps sont réalisés pour pouvoir analyser un nombre plus important de bases. Après la migration, le gel est fixé pendant 15 minutes dans une solution contenant 20% de méthanol et 10% d' acide acétique. Le gel est placé entre une feuille de papier Watman et un film de plastique, avant d'être séché sous vide 30 minutes à 80°C.

Le gel est exposé sur un film photographique XOMAT pendant 2 à 3 jours.

La séquence nucléotidique est enregistrée et analysée à l'aide du programme PC gene (programme 6.7, Intelligenetics Inc.) et traduite en séquence peptidique.

III.5. Southern blot

III.5.1. Marquage de la sonde

Le marquage de la sonde (le fragment de 200pb amplifié par PCR) est réalisé par Random Priming (Boehringer Mannheim: Random Primed DNA labeling kit).

25 ng de la sonde repris dans un volume de 10μl est dénaturé 10 minutes à 95°C, on ajoute ensuite 1μl de dGTP 0,5 mM, 1 μl de dCTP 0,5 mM, 1 μl de dTTP 0,5 mM, 2 μl de tampon 10 X (qui contient les hexanucléotides qui vont s'hybrider sur le DNA), 5 μl de dATP marqué au phosphore 32 (25 μcuries), et

1 μl de polymérase de Klenow (qui permet la synthèse du brin complémentaire de la sonde à partir de l'extrémité 3' OH des hexanucléotides). Le mélange est incubé 30 minutes à 37°C. La réaction est arrêtée par un chauffage de 10 minutes à 65°C. Le mélange est ensuite passé sur une colonne G50 Séphadex.

III.5.2. Préparation de la membrane

100 μg de DNA de la souche pK est digéré par diverses enzymes de restriction (ECORI, Pst I). Le DNA digéré est séparé par électrophorèse dans un gel d'agarose à 1%. Le gel est traité pendant 15 minutes dans l'HCl 0,25 N qui provoque une dépurination partielle afin de permettre le transfert des fragments de grande taille (supérieurs à 10 Kb). Le gel est rincé dans l'eau, et est dénaturé par du NaOH 0,4 N pendant 30 minutes. Le gel est transféré sur une membrane de nitrocellulose Immobilon par cappilarité pendant 12 heures. La membrane est lavée par une solution de SSC 2 X (0,3 m NaCl / 0,03 M citrate de sodium). Elle est ensuite cuite pendant 2 heures à 80°C.

* Préhybridation

La membrane est préhybridée pendant 12 heures à 42°C dans la solution suivante:

- SSC 2 X
- 50 mM de Phosphate de sodium pH 6,8
- milieu de Denhardts 5 X (0,1% de serum albumine bovine, 0,1% de polyvinylpyrrolidone, 0,1% Ficoll 400)
- 100 μg/ml de DNA de sperme de saumon dénaturé 5 minutes par ébullition.

* Hybridation

L'hybridation se fait dans la même solution à laquelle on rajoute la sonde radio marquée, 10% de dextran sulfate, pendant 12 heures.

Les lavages de la membrane se font dans le milieu SSC 2 X à la même température que l'hybridation. La membrane est mise en exposition sur un film autoradiographique.

IV. Procédures expérimentales d'induction de la différenciation des tachyzoïtes vers le stade bradyzoïte

Les tachyzoïtes de la souche RH sont prélevés dans la cavité péritonéale d'une souris infectée, ou proviennent de cultures.

La technique de double marquage en IF a été utilisée pour permettre d'étudier l'expression des protéines de bradyzoïtes et de tachyzoïtes.

IV.1. Modification du pH du milieu de culture

Les cellules hôtes cultivées sur des lamelles de verre plaçées dans des chambres de culture à 4 puits de 2 cm^2, sont infestées par les parasites dans le milieu normal de culture (DMEM, 5% SVF, sous 5% de CO2).
Six heures après infection, le milieu est remplacé par un milieu modifié ajusté à pH 8. Les cultures sont placées dans une étuve à 37°C sans CO2 pour éviter une variation de pH due à la présence du CO2. Les cultures témoins sont réalisées dans le milieu classique d'entretien des cellules.

Le milieu modifié a la composition suivante: c'est le milieu de base RPMI 1640 (Boehringer - Mannheim) contenant:

- 50 mM HEPES (Sigma)
- 2 g/l NaHCO3
- 5 % SVF
- 2 mM de Glutamine
- 50 u/ml de Pénicilline et 50 μg/ml de Streptomycine

Le milieu est ajusté à pH 8 avec de la soude concentrée, puis filtré sur filtre de 0,22 μm.

IV.2. Modification de la température d'incubation

Les cellules Véro cultivées sur des lamelles de verre plaçées dans des flacons de culture de 25 cm^2, subissent un prétraitement à 43°C pendant 2 heures, puis retournent à 37°C pour une heure. Les parasites sont ensuite inoculés. Deux heures après l'infection, les cellules sont remises à 43°C pour une durée de 12 à 48 heures selon les expériences. Puis les cultures

retournent à 37°C jusqu'à la fin de l'expérience. Le premier traitement à 43°C réalisé avant l'infection permet aux cellules de devenir thermotolérantes, et donc de résister à un traitement plus long à 43°C lors du second choc thermique (Selawry *et al*, 1975; Henke and Dethlefen, 1978). En effet sans ce premier choc, les cellules ne resisteraient pas un traitement prolongé à 43°C. Les cultures " témoin " demeurent à 37°C tout au long de l'expérience.

IV.3. Arsenite de Sodium

4 à 6 heures après l'infection des cellules par les tachyzoïtes, le milieu est remplacé par du milieu contenant de l'arsenite de sodium (concentrations allant de 10^{-5} à 5.10^{-7} M). Le traitement est maintenu jusqu' à la fin de l'expérience.

IV.4. Interféron gamma

Les fibroblastes humains sont prétraités avec de l'interféron humain recombinant (Roussel Uclaf) à 150 U/ml, 24 heures avant l'infection, le milieu utilisé renfermant du sérum de veau foetal dialysé. L'infection est réalisée en absence IFN gamma pendant 4 heures puis les cellules infectées sont à nouveau traitées jusqu'à la fin de l'expérience.

IV.5. Utilisations des inhibiteurs de la chaine respiratoire motochondriale

Deux inhibiteurs ont été utilisés: La rotenone et le myxothiazol, ainsi qu'un donneur d'oxyde d'azote: le nitroprussiate de sodium (SNP).
Les cellules véro sont platées sur des lamelles de verre et infectées par les parasites de la souche pK 24 heures plus tard. Six heures après l'infection, les cellules sont traitées par la Rotenone (0,05 mM; 0,025 mM; et 0,01 mM), par le Myxothiazol (0,1 μg/ml; 0,05 μg/ml; et 0,01 μg/ml), par le SNP (100 μM, 50μM, et 10 μM). Les cellules sont fixées 48 heures et 96 heures après infection pour la détection en immunofluorescence.

L'étude *in vitro* de l'interconversion de stade; tachyzoïte – bradyzoïte a été réalisée grâce à une technique de double marquage en immunofluorescence, permettant de détecter des protéines spécifiques du bradyzoïte (P36, ou P34, ou P21, ou P18) et une protéine spécifique du tachyzoïte (SAG1) sur une même préparation.
Ceci nous a permis d'observer différentes combinaisons:

- vacuoles au sein desquelles les parasites n'expriment que SAG1, les protéines de bradyzoïtes ne sont pas exprimées.

- vacuoles renfermant des parasites exprimant à la fois SAG1 et les protéines de bradyzoïtes (P36, P34, et P18).

- "vacuoles" contenant des parasites n'exprimant que les protéines de bradyzoïtes.

Avant d'étudier les facteurs déterminant le déclenchement de la différenciation parasitaire chez *Toxoplasma gondii*, nous avons entrepris d'analyser le processus spontané de conversion de stade lors de la mise en culture *in vitro* de bradyzoïtes (libérés des kystes de cerveau de souris) et de tachyzoïtes (prélevés à partir de la cavité péritonéale de souris infectées).

I. Etude *in vitro* de la différenciation spontanée des zoïtes de *Toxoplasma gondii.*

I.1. Conversion du stade bradyzoïte vers le stade tachyzoïte (souches 76K et BQNC2). [article 1]

Lorsque les bradyzoïtes, issus de cerveau de souris sont mis en culture (cellules Véro), aucun changement antigénique n'est détecté durant les 15

premières heures de l'infection; les parasites expriment les 4 protéines P36, 34, 21 et 18, aucun d'entre eux n 'exprime SAG1 . A 15 heures certains parasites commencent à exprimer SAG 1 tout en continuant d'exprimer les protéines spécifiques du bradyzoïte (article 1, fig 1a et 1b). Ce sont des stades dits intermédiaires, porteurs d'une double spécificité antigénique bradyzoïte et tachyzoïte. A 24h, la division parasitaire débute, et nous observons la multiplication des stades intermédiaires. Une analyse semi - quantitative de la cinétique de transformation des bradyzoïtes en tachyzoïtes a été réalisée (article 1, table 1). A partir du temps 48 heures, l'analyse quantitative n'est plus possible car le processus de réinvasion commence; les parasites après plusieurs cycle de réplication sont libérés de leur vacuole parasitophore et provoquent la lyse de la cellule hôte et générent des foyers de multiplication ou les numérations perdent toute signification.

A 48h, la majorité des parasites sont intermédiaires, et sont en voie de multiplication, certains réagissent plus fortement avec les marqueurs spécifiques des bradyzoïtes, d'autres expriment plus intensément SAG1 (article 1, fig 2a et 2b). Quelques parasites ont perdu l'expression des protéines spécifiques de bradyzoïtes et n'expriment que SAG 1.

Le nombre relatif des stades intermédiaires va diminuer au cours de la culture, en raison de la disparition de l'expression des protéines de bradyzoïtes et de la multiplication des tachyzoïtes qui dilue les autres stades. Une faible partie de l'inoculum de départ reste sous la forme bradyzoïte et génère des parasites n'exprimant que les protéines spécifiques de bradyzoïte après multiplication. La taille de ce type de formation est plus petite que la taille des vacuoles renfermant des stades intermédiaires, suggérant une vitesse de multiplication plus lente.

L'infection des cellules avec des bradyzoïtes de la souche BQNC2 entraîne la formation de vacuoles hétérogènes (article 1, fig 3 et 4); au sein d'une même vacuole nous observons des parasites exprimant différentes spécificités antigéniques (des parasites exprimant exclusivement les marqueurs spécifiques des bradyzoites, des parasites n'exprimant que SAG 1, et des parasites porteurs de la double spécificité antigénique).

I.2. Conversion du stade tachyzoïte vers le stade bradyzoïte: souche Prugniaud [article 1]

Les parasites issus du péritoine de souris n'expriment pas de protéines spécifiques de bradyzoïtes. Ce sont des tachyzoïtes qui expriment SAG1. Nous avons entrepris d'observer la cinétique de transformation en bradyzoïtes, sachant que les parasites de la souche Prugniaud sont capables de produire des formations kystiques en culture (Dardé *et al*, 1989).

A 24 heures , nous trouvons essentiellement des tachyzoïtes en voie de multiplication. A 48h certains parasites commencent à exprimer des protéines spécifiques de bradyzoïtes (P36, P34, et P18); seule l'expression de la protéine P21 n'est pas observée. Après 3 jours, un petit nombre de parasites a perdu l'expression de SAG 1. Il faut cependant attendre 6 jours pour observer l'expression de la P21 au sein de parasites ayant perdu l'expression de SAG1. Cependant la majorité de l'inoculum de départ se développe sous la forme tachyzoïte. Au cours de cette étude, nous avons également observé la présence de vacuoles "hétérogènes", similaires à celle observées avec la souche BQNC2.

I.3. Conversion des sporozoïtes de la souche 76K

Les sporozoïtes sont libérés des sporocystes purifiés à partir des fécès de chatons infectés par des kystes de la souche 76K. La protéine SAG1 n'est pas exprimée par les sporozoïtes issus des sporocystes, ainsi que les 4 protéines de bradyzoïte P36, P34, P18 et P21. Par contre, ces derniers expriment SAG3 (protéine retrouvée chez tous les stades), et la plupart des protéines de rhoptries et des granules denses testées, excepté GRA3. Ce dernier résultat devra être reconfirmé pour vérifier qu'il ne s'agit pas là d'un artéfact de manipulation.

Dés la sixième heure de culture, SAG1 est rapidement exprimé en quantité détectable en IF. La division parasitaire est observée vers la 24 ^{ième} heure de culture.

Certains parasites commencent à exprimer les protéines spécifiques du stade bradyzoïte (P36 et P18) à partir du septième jour de culture.

L'étude de l'expression de quelques molécules parasitaires lors des 24 premières heures de culture de sporozoïtes, est représentée dans le tableau ci –

dessous.

Protéines détectées	1 heure	6 heures	24 heures première division
SAG 1 P30	–	+	++
SAG3 P43	++	++	++
ROP 1	+	+	ND
ROP 2-3-4	+	+	ND
GRA 1	+	+	ND
GRA 2	+	+	ND
GRA 3	–	–	ND
GRA 5	+	ND	ND
P18	–	–	–
P21	–	–	–
P34	–	–	–
P36	–	–	–

Légende:

– : absence de fluorescence, + : fluorescence faible, ++ : fluorescence forte, ND : Non Déterminé.

II. Etude expérimentale de la conversion du stade tachyzoïte vers le stade bradyzoïte

II.1. Traitements inducteurs de la différenciation vers le stade bradyzoïte (souche RH): analyse semiquantitative par des techniques d'IF. [article 2]

L'observation fortuite de l'augmentation de l'expression des bradyzoïtes dans des cellules réalisées dans des conditions défavorables (épuisement du milieu de culture), laissait suggérer que des altérations métaboliques pouvaient être impliquées dans le processus de différenciation. Nous avons donc exploré l'influence de modifications des conditions de culture. La souche RH fut utilisée au

départ afin d'éviter l'expression spontanée de molécules de bradyzoïtes survenant *in vitro* avec certaines souches (comme décrit plus haut). Quelques travaux laissaient suggérer que la souche RH possédait la capacité à former des kystes, et donc devait pouvoir exprimer des protéines de bradyzoïtes. Nous avons effectivement confirmé cette hypothèse et montré que la souche RH était capable d'exprimer des protéines spécifiques de bradyzoïtes. Cela peut même se produire parfois spontanément en culture, bien que le taux soit faible.

L'induction de l'expression de protéines spécifiques de bradyzoïtes a été analysée comme précédemment par une technique de double marquage en IF. Une analyse quantitative de l'induction de la différenciation vers le stade bradyzoïte (expression des protéines de bradyzoïtes) a été effectuée avec divers traitements (augmentation du pH, de la température, stress chimique par l'arsenite de sodium, interféron gamma) afin d'évaluer leur efficacité respective. La quantification a été faite en utilisant l'anti P36 comme marqueur spécifique de bradyzoïtes, et l'anti SAG 1 comme marqueur de la population totale. En effet, dans l'intervalle de temps de l'étude quantitative (48 heures maximum), tous les parasites expriment SAG 1. Le nombre total de vacuoles et le nombre de vacuoles renfermant des parasites exprimant la P36 ont été comptabilisés. Le pourcentage de différenciation (nombre de vacuoles avec expression des protéines de bradyzoïtes par rapport au nombre total de vacuoles) dans le témoin et dans la culture traitée a été calculé en se réferant systématiquement au nombre total de vacuoles dans le témoin, afin de tenir compte de la diminution de la parasitémie pouvant éventuellement survenir dans les cultures traitées. En effet, les traitements pourraient sélectionner simplement les parasites en voie de différenciation (puisque dans le témoins certains se différencient spontanément) et être toxiques pour les autres, ce qui augmenterait artéfactuellement le pourcentage de différenciation.

II.1.a. Modification du pH: (cellules véro et fibroblastes humains)

L'augmentation du pH (pH élevé à 8) du milieu de culture auquel on a ajouté une solution tampon Hépès 40 mM permet d'obtenir jusqu'à 60 à 70% de vacuoles contenant des parasites exprimant SAG1 et la P36, après 2 jours de traitement (article 2, fig 1 et 2), que ce soit en cellules Véro ou en fibroblastes utilisées comme

cellules hôtes. Cependant ces pourcentages varient selon les expériences en raison de la difficulté à maintenir le pH à niveau constant. En effet, si le pH chute en cours d'expérimentation, l'induction de la différenciation est nettement moins efficace.

Le pourcentage de parasites exprimant la P36 dans les cultures contrôles varient de 0 à 10% selon l'expérience. Après 4 jours de culture, dans les cultures témoins, nous observons la lyse cellulaire par les foyers de multiplication des tachyzoïtes. Dans les cultures à pH 8, nous observons essentiellement des vacuoles renfermant des parasites intermédiaires et des foyers de multiplication de tachyzoïtes.

Au bout de 6 jours, certains parasites expriment exclusivement les protéines spécifiques de bradyzoïtes, SAG1 n'est plus exprimée ou n'est plus détectée en IF. Nous n'avons jamais observé l'expression de la P21 avec les parasites de la souche RH.

Ce traitement s'est révèlé particulièrement efficace sur la souche pK. Après deux jours de traitements, la quasi totalité des parasites expriment la P36 tout en conservant l'expression de SAG1 (planche I, fig. 1), bien qu'une forte diminution de la parasitémie soit observée. L'expression de la P36 débute dès le premier jour de traitement. A 7 jours, la majorité des parasites ont perdu l'expression de SAG 1 et se retrouvent dans des structures kystiques (planche I, fig. 2). Certains de ces kystes renferment des parasites dont une partie seulement exprime la P21 (planche I, fig. 3).

En contraste de phase, les parasites SAG 1 négatifs sont étroitement serrés les uns contre les autres (planche I, fig. 1b et 2b), et l'aspect est différent d'une vacuole renfermant des tachyzoïtes où l'espace vacuolaire est généralement plus important, et où les parasites sont groupés de façon plus lâche (planche II, fig. 1b).

Dans le cas où l'induction de la différenciation n'est pas optimale, nous observons de larges "vacuoles" contenant des parasites exprimant la P36 à des degrés variés et dont la plupart expriment SAG1.(planche I, fig. 4)

II.1.b. Modification de la température

Après un traitement de 2 jours à 43°C, environ 45% des vacuoles renferment des parasites exprimant une double spécificité antigénique (article 2, fig 4). Ce traitement est plus toxique qu' un traitement à pH 8; nous observons une diminution

significative du taux de parasitémie par rapport au témoin non traité. Environ 50% de l'inoculum de départ est perdu, soit par perte de cellules hôtes, soit par toxicité directe du choc thermique sur les parasites. cette technique, de plus, présente des problèmes de reproducibilité: au cours d'une même expérience certaines cultures montrent une bonne induction de la différenciation alors que d'autres, au contraire, ont échoué.

Un traitement de 2 jours à 43°C (et retour à 37°C ensuite) est suffisant pour observer au bout de 6 jours de culture, des formations kystiques. Il est difficile de prolonger la culture au delà, car les tachyzoïtes non transformés lysent les cellules par leur multiplication active.

Puisqu'un choc thermique est capable d'entrainer vers la voie de différenciation en bradyzoïte, nous avons testé l'action d'inducteurs de stress chimique.

II.1.c. Arsenite de sodium

L'arsenite de Sodium s'est révélé bon inducteur de l'expression de protéines spécifiques de bradyzoïtes. Par contre le Cadmium n'a eu aucun effect sur la différenciation. Le traitement par l'Arsenite de sodium (2.10^{-6} à 10^{-6} M) permet d'obtenir jusqu'à 80% de vacuoles intermédiaires après 2 jours (article 2, fig 6 et 7). Seules quelques structures kystiques peuvent être observées après 6 jours de culture, au sein de foyers de parasites intermédiares, les parasites continuent à se multiplier comme des tachyzoïtes tout en conservant l'expression de protéines de bradyzoïtes. Des concentrations trop élevées en arsenite de sodium bloquent totalement la multiplication des parasite sans induire l'expression de protéines de bradyzoïtes.

II.1.d. Interféron gamma (sur fibroblastes humains)

L'IFN gamma ne permet qu'une légère induction de l'expression de protéines de bradyzoïtes (article 2, fig 8). Le traitement est responsable d'une diminution de la parasitémie et du taux de multiplication des parasites.

NB: La déplétion en sérum ou en glucose dans le milieu de culture a été testé et

s'est révélée pas ou peu inductrice de l'expression de protéines de bradyzoïtes, la déplétion en acides aminés également.

II.2. Comparaison de l'effet de divers traitements sur l'induction de l'expression de la P36 et sur l'inhibition de la multiplication (souche pK, cellules véro) (planches III et IV)

Les divers traitements sont: le milieu pH8, traitement au nitroprussiate de sodium qui est un donneur chimique de NO (monoxyde d'azote), et l'utilisation de deux inhibiteurs de la chaîne respiratoire mitochondriale: la rotenone qui bloque la chaine de transport des électrons au niveau de la NADH – Q Reductase, et le myxothiazol.

Le taux d'expression de la P36 a été utilisé comme marqueur de l'induction de la différenciation vers le stade bradyzoïte. Le temps d'étude est 48 heures. A ce stade, tous les parasites expriment encore SAG1. Pour chaque traitement le pourcentage de parasites exprimant la P36 (en fait c'est le nombre de vacuoles qui a été numéré) est calculé en fonction du nombre total de parasites (vacuoles) dans l'expérience témoin (pas de traitement) pour tenir compte de l'effet des traitement sur la parasitémie.

Le taux de multiplication (nombre de parasites par vacuole) en distinguant les vacuoles avec expression de la P36 et celles n'exprimant pas la P36, a été évalué afin d'étudier l'influence de l'inhibition de croissance sur la différenciation (planche IV).

* **Le milieu pH 8**, bien que responsable d'une forte diminution de la parasitémie (environ 40%) permet une conversion pratiquement totale. Tous les parasites qui survivent, expriment la P36 (planche III, fig. D). Ces parasites ont un taux de multiplication ralenti: on trouve en moyenne 8 à 10 parasites par vacuole (planche IV). Dans le témoin, il est difficile d'évaluer ce taux, la réinvasion a déjà eu lieu (au delà de 36 parasites par vacuoles pour celles qui n'ont pas encore éclaté).

* **Le nitroprussiate de sodium** permet jusqu' à 35% d'expression de la P36

pour des concentration de 100 à 10μM (planche III, fig. A). Le traitement est responsable d'une diminution de la parasitémie qui s'atténue pour les concentrations les plus faibles. La croissance des parasites est largement inhibée (4 à 6 parasites par vacuoles selon les concentrations), aussi bien pour les parasites qui se différencient (ceux exprimant la P36) que pour les tachyzoïtes. Le taux de multiplication est légèrement plus bas pour les parasites P36 +.

* **Le myxothiazol** diminue légèrement la parasitémie. Le taux de conversion est relativement constant (environ 40%) pour les 3 concentrations utilisées (0,1 – 0,05 – et 0,01 μg/ml) (planche III, fig. B). Par contre le taux de multiplication varie: taux de 1 à 2 parasites par vacuole pour 0,1 et 0,05 μg/ml, il passe à 4–5 parasites pour 0,01μg/ml. Nous n'avons pas observé de différences majeures entre les parasites P36+ et P36– au niveau du taux de croissance.

* **Le traitement par la rotenone** 0,02 mM diminue de moitié la parasitémie, et la majorité des parasites (plus des 4/5) expriment la P36 (planche III, fig. C), l'effet semble comparable au milieu pH8. le taux de multiplication est plus bas: en moyenne 2 parasites par vacuoles. Il n'a pas été possible de réaliser une quantification précise du nombre de parasites par vacuole pour les 2 autres concentrations étudiées (0,01 et 0,001 mM): leur nombre est généralement égal ou supérieur à 16 pour la plupart des vacuoles, et au delà de 32 parasites la numération devient impossible. Bien que les concentrations 0,1 mM et 0,02 mM donnent un taux de conversion identique (environ 40%), le degré d'inhibition de la multiplication n'est pas comparable. La concentration 0,02 mM entraîne une inhibition pratiquement totale de la multiplication; avec la concentration 0,01 mM, les vacuoles renferment au minimum 16 parasites, souvent plus, et de telles vacuoles renferment aussi bien des parasites exprimant ou n'exprimant pas la P36.

III. Etude ultrastructurale de la conversion des tachyzoïtes vers le stade bradyzoïte, *in vitro*.

Une étude ultrastructurale du phénomène de différenciation vers le stade bradyzoïte a été réalisée avec la souche pK et la souche RH. Le traitement milieu pH 8 a été utilisé pour induire la conversion, car la quasi totalité des parasites qui survivent s'engage dans la voie de différenciation bradyzoïte, rendant plus facile l'interprétation des modifications morphologiques observées.

Pour la souche pK, dès 24 heures de traitement à pH 8, nous observons l'apparition de l'expression de la P36. L'aspect en microscopie électronique d'une telle vacuole montre une modification du réseau tubulomembranaire (planche V, fig. A). Le terme de réseau n'est plus adapté, car les longues invaginations caractéristiques de la vacuole renfermant des tachyzoïtes ne sont pratiquement plus retrouvées.

Dès 48 heures, la modification de la vacuole se traduit par l'accumulation d'un matériel dense et granulaire tapissant la membrane de la vacuole, le réseau tubulomembranaire disparait, quelques tubules restant en sont le vestige (planche V, fig. B). Cependant à ce stade, le parasite possède les caractéristiques d'un tachyzoïte: peu de micronèmes et de grains d'amylopectine. Au fil du temps, les parasites vont être peu à peu inclus dans un matériel granulaire. Dès le septième jour de culture, la paroi kystique est limitée par une membrane au contenu sinueux, doublée sur sa face interne par des vésicules et des tubules (planche VI, fig. C), cette paroi est similaire à celle des kystes observés *in vivo* dans le cerveau de souris infectées par des souches avirulentes. Un tel compartiment (avec la souche pK) peut contenir soit des parasites dont la morphologie est encore très proche de celle des tachyzoïtes (planche VI, fig. B), soit des parasites qui commencent à présenter les caractéristiques de bradyzoïtes avec une plus grande richesse en micronèmes et en grains d'amylopectine (planche VI, fig. A). La paroi kystique est constituée d'un matériel plus dense que celui retrouvé entre les parasites.

Les parasites contenus dans les kystes de la souche RH, quant à eux conservent les caractéristiques des tachyzoïtes et certains sont en cours d'endodyogénie (article 2, fig 3). Ces parasites (souche RH et PK) possédent des

rhoptries avec une structure en nid d'abeille.

L'immunolocalisation d'une protéine de 116KD décrite par Weiss (1991) sur des coupes à congélation de telles préparations montre une accumulation précoce dès 48 heures au niveau de la "paroi" (planche VII). En IF, le marquage de la paroi est intense (planche II, fig. 3et 4). Dans une culture témoin de tachyzoïtes pK, un léger marquage est observé au niveau de certaines vacuoles parasitophores (planche II, fig. 1 et 2). La localisation précise au sein du parasite n'a pu être déterminée.

Le matériel granulaire (de nature moins dense) présent entre les parasites dans les kystes ne semble pas contenir cette protéine. Un marquage de la membrane des parasites est également observé chez les kystes à 7 jours (planche VII, fig. B). La protéine GRA 3 est retrouvée dans la paroi et dans la membrane kystique (planche VIII, fig. A), GRA2 seulement dans la paroi (planche VIII, fig. B).

Sur des kystes de la souche pK, à 7 jours, l'anticorps anti P21 (spécifique du bradyzoïte et la dernière à être exprimée en IF) donne un marquage au niveau des micronèmes (planche VIII, fig. C).

IV. Caractérisation d'une protéine spécifique du stade bradyzoïte: la P18 (souche pK)

L'anticorps monoclonal T8 3B1 identifie une protéine de 18Kd, la P18 chez les bradyzoïtes issus des kystes de cerveau de souris. La P18 a pu être purifiée par immunoaffinité à partir d'un lysat NP40 de cultures infectées par la souche PK ayant subi un traitement à pH 8 durant 3 jours.

IV-1. La P18: protéine de surface

La protéine est accessible à la sulfo NHS Biotine (planche X, fig. A). Cette petite molécule hydrophile a la propriété de ne pas traverser les membranes, donc seules les molécules de surface sont marquées. Les molécules ROP 2,3,4 localisées dans les rhoptries (organites intracellulaires) ne sont pas biotinylées.

L'immunodétection de la P18, sur des coupes à congélations de culture ayant subi un traitement à pH 8 (planche IX), confirme une localisation membranaire sur les parasites.

IV-2. Marquages métaboliques

La P18 peut être marquée métaboliquement par l'Isoleucine tritiée (planche X, fig. B), mais pas par la méthionine ^{35}S.

Un léger marquage est obtenu avec la glucosamine tritiée (planche X, fig. C).

IV-3. Microséquençage de la P18

Après purification par immunoaffinité, séparation par electrophorèse préparative SDS Page en condition dénaturante non réductrice, transfert sur membrane PVDF, la bande de 18 Kd a été soumise à un microséquençage de la partie N terminale, par la méthode de dégradation d'Edman, en collaboration avec le laboratoire du Professeur Jos Van Beeumen de l'Université de Gand. L'extrémité n'étant pas bloquée, le séquençage a été réalisée jusqu'à 25 résidus, dans un premier temps. Des essais d'amplification par PCR sur une banque de cDNA (réalisée à partir des ARN messagers de bradyzoïtes issus de kystes de cerveau de souris infectées par la souche 76K) en utilisant des oligonucléotides déduits de

la séquence N terminale (dégénérés et non dégénérés) et un oligonucléotide poly dT n'ont pas permis d'isoler l'ARN messager correspondant à la P18.

Dans un deuxième temps, la composition en acides aminés de la P18 a été réalisée. La composition à 10% d'erreur près sur le nombre de résidus calculé est la suivante:

Asx: 18,3%	**Glx: 22,2%**	**Ser: 11,8%**	**Gly: 13,3%**	**His: 1,7%**
Arg: 0,4%	**Thr: 13,3%**	**Ala: 13,8%**	**Pro: 15,6%**	**Tyr: 2,6%**
Val: 13,8%	**Met: 00,8%**	**Ile: 6,6%**	**Leu: 09,0%**	**Phe: 6,1%**
Lys: 14,7%				

NB: Les résidus tryptophane et cystéine sont détruits au cours de l'hydrolyse

La protéine fut soumise à une digestion par une Lysine – C endoprotéinase, la P18 étant riche en Lysine (environ 15).
Les peptides obtenus après digestion sont séparés sur une colonne C8 RPLC et leur séquence N terminale est déterminée. Les 50 premiers acides aminés de la protéine et une séquence interne de 11 résidus ont été ainsi identifiés.
Les acides aminés connus sont les suivants:

1
K S W T Y D F K K A L D D D E T K K E I I T P G D S V S I E N S G S
P L E Y I P P N (W) S Q V L (M) K .....D E P V E L A A L F K .....
séquence interne

Les résidus entre parenthèse sont des résidus dont la détermination est incertaine.

Des oligonucléotides dégénérés déduits de la séquence interne et un oligonucléotide déduit de la séquence N terminale, utilisés comme primers 3' et 5' respectivement ont permis d'amplifier un fragment d'environ 200 paires de bases à partir du DNA génomique de toxoplasme (souche RH, et souche pK) et également

à partir de cDNA (souche 76K). Ce fragment a pu être réamplifié à l'aide de primers 5' et 3' internes (planche XI). Ce fragment a été cloné et séquençé. La séquence en acides aminés traduite de la séquence nucléotidique du fragment amplifié correspond à celle de la P18, au moins pour les cinquantes premiers résidus connus (planche XI).

Une sonde radioactive a été réalisée par "random priming" à partir du fragment de 200 pb amplifié. Cette sonde est capable de s'hybrider à l'ADN génomique (souche pK) digéré (Southernblot). Sur du DNA digéré par l'enzyme de restriction Hind III, la sonde reconnaît un fragment de 21 000 paires de bases (pb), et sur du DNA digéré par l'enzyme Pst I, un fragment de 3600 pb.

DISCUSSION

L'étude du déterminisme de la conversion de stade chez *Toxoplasma gondii* a constitué l'essentiel du travail rapporté dans ce mémoire. Le phénomène de conversion spontanée et celui induit expérimentalement ont été tous deux analysés. Ce travail a permis également d'approfondir la caractérisation de molécules spécifiques de stade ouvrant des perspectives d'étude de la régulation de la conversion au niveau génique. Ces divers points seront successivement discutés.

I. Etude *in vitro* de l'interconversion entre stades

I-1. Les marqueurs spécifiques de stade

L'étude d'un mécanisme de conversion de stade nécessitait de disposer de marqueurs spécifiques de ces stades. Les travaux antérieurs portant sur la conversion de stade, reposaient sur les différences morphologiques existant entre les stades tachyzoïte et bradyzoïte et sur la formation de la paroi kystique, qui étaient les seuls critères disponibles d'identification et qui nécessitaient le plus souvent le recours à la microscopie électronique. Le développement récent de sondes monoclonales spécifiques de stade, notamment spécifiques du bradyzoïte (Omata *et al*: 1989, Tomavo *et al*: 1991, Weiss *et al*: 1992, Gross *et al*: 1992) était le préalable à une analyse plus fine du phénomène *in vitro*.

Notre groupe (Tomavo *et al*, 1991) a identifié 4 molécules de 36, 34, 21, et 18 kDa, spécifiques du stade bradyzoïte. Ces dernières ont été décrites initialement comme des protéines pelliculaires, avec pour celles de 21 et 18 kDa la suggestion d'une exposition superficielle en raison de leur sensibilité à la trypsine.

Nos résultats ont apporté des éléments nouveaux permettant de préciser la localisation des 4 antigènes caractérisés. Nos expériences de biotinylation ont confirmé la localisation de surface pour la P36 et la P18. Les études d'immunodétection en microscopie électronique sur des kystes obtenus *in vitro*, ont montré un marquage membranaire des parasites pour la P18, et un marquage apical au niveau des micronèmes pour la P21. Cette localisation apicale est d'ailleurs corrélée avec celle observée en IF sur des préparations de même type. Cependant ce résultat demande à être reconfirmé et vérifié sur des kystes obtenus *in vivo*.

Nous avons par ailleurs montré que les sporozoïtes (au moins ceux de la

souche 76K) n'expriment aucune de ces 4 molécules définies comme spécifiques des bradyzoïtes (au moins chez la souche 76K), ce qui n'avait pas encore été vérifié. Les sporozoïtes issus de sporocystes et mis en culture vont commencer à exprimer la protéine SAG1 quelques heures après l'invasion (5 à 6 heures), il faudra attendre 7 jours pour observer l'expression de la P36 et de la P18 sur quelques parasites. Ceci pourrait expliquer que le chat présente des périodes d'incubation plus ou moins longues pour la production d'oocystes, selon le stade infestant. Alors qu'un délai de 3 jours est suffisant pour observer des oocystes dans les féces des chats après ingestion de kystes, une période de 5 à 10 jours lors de l'ingestion de tachyzoïtes et une période de 20 à 24 jours lors d'ingestion d'oocystes ont été rapporté pour observer l'émission d'oocystes par le chat. Cela suggère un passage impératif par le stade tachyzoïte après le stade sporozoïte.

Les différences antigéniques majeures identifiées jusque là entre le tachyzoïte, le bradyzoïte et le sporozoïte affectent principalement les molécules superficielles (absence de SAG1 et présence de nouvelles protéines chez le bradyzoïte et le sporozoïte). Le tachyzoïte voit son existence extracellulaire se dérouler essentiellement dans les lumières internes (sérum, liquides interstitiels), c'est la forme de propagation. Le bradyzoïte libéré dans le tractus intestinal de l'hôte est capable de résister aux enzymes digestives (pepsine, trypsine), contrairement au tachyzoïte qui y est sensible (Sharma et Dubey, 1981)), les bradyzoïtes pouvant ainsi assurer la transmission du parasite. La résistance des bradyzoïtes aux enzymes digestives (pepsine et trypsine) est une propriété les distinguant des tachyzoïtes, l'existence de molécules différentes à leur surface pourrait y être liée. Les sporozoïtes, quant à eux, passent également dans l'estomac mais sont vraisemblablement protégés de l'action des enzymes digestives car ils sont renfermés à l'intérieur du sporocyste à ce stade. Leur libération se fera seulement au niveau de l'intestin.
Ces divers stades sont confrontés à des conditions environnementales différentes qui sont susceptibles d'affecter la surface du parasite en premier lieu. Il est possible que les divergences dans leur composition moléculaire superficielle puissent être liées aux biotopes et leur permettent en conséquence, de posséder des propriétés particulières. Il serait nécessaire de caractériser la fonction de ces différentes protéines

superficielles pour en décider. Jusqu'à présent, le rôle biologique des antigènes majeurs de surface du tachyzoïte comme du sporozoïte demeure inconnu. Des mutants parasitaires déficients en protèines SAG1 ou SAG2 ne semblent pas se comporter différemment de la souche mère.

I-2. Caractérisations biochimique et moléculaire de la P18

Nos méthodes d'induction de la différenciation vers le stade bradyzoïte ont permis d'approfondir la caractérisation de la P18. Auparavant, la difficulté à obtenir des bradyzoïtes (provenant de kystes issus de cerveaux de souris infectées) en quantité compatible avec l'analyse rendait impossible toute analyse biochimique des protéines spécifiques de bradyzoïtes. La protéine P18 a pu être purifiée par immunoaffinité à l'aide de l'anticorps monoclonal correspondant, à partir de parasites obtenus *in vitro* et en cours de différenciation vers la voie bradyzoïte. Cette protéine a été retrouvée chez plusieurs souches (RH, Prugniaud, et pK).

Il est possible d'analyser sa biosynthèse par un marquage métabolique à l'isoleucine tritiée sur une culture infectée et placée en condition d'induction d'expression des protéines de bradyzoïtes. Une bande intense à 18 kDa et une bande mineure à 21 kDa sont marquées, cette bande de plus haut poids moléculaire est également reconnue par l'AcMc en Western Blot sur des bradyzoïtes provenant de kystes obtenus *in vivo*. Il aurait pu s'agir du précurseur de la P18 puisque les bradyzoïtes possèdent un métabolisme ralenti et donc pourraient présenter un renouvellement de synthèse de protéines plus lent. Les expériences de marquage - chasse n'ont pas permis de donner une conclusion définitive. Cependant nos expériences de biotinylation de protéines de surface confirmant la localisation superficielle de la P18, montrent également une localisation en surface (accessible à un marquage par une biotine) pour cette bande mineure, allant contre l'hypothèse d'un précurseur de la P18.

Cette protéine P18 est capable également d'incorporer légèrement de la glucosamine tritiée. En raison de la faible intensité du marquage, il est peu probable que la protéine soit modifiée post - traductionnellement par des O ou N glycosylations. Les molécules de sucre sont des éléments constamment rencontrés dans les motifs d'ancrage membranaire type glycosyl phosphatidyl inositol (GPI), le

marquage glucosamine de la P18 pourrait correspondre à l'existence d'un tel groupement GPI. D'ailleurs, les 5 molécules majeures de surface du tachyzoïtes sont ancrées à la membrane par un ancrage type GPI (Nagel and Boothroyd 1989, Tomavo *et al*: 1989, 1991).

Cependant nos tentatives de mise en évidence (par action de la phospholipase C) n'ont pas permis d'obtenir une réponse convaincante. Des marquages par de l'acide palmitique, myristique et par de l'ethanolamine devront être envisagés pour aller plus loin dans cette investigation.

L'étude de la caractérisation moléculaire de la P18 a pu être commencée lorsqu'une partie de sa séquence N terminale en acides aminés a été caractérisée. Des oligonucléotides déduits de cette séquence ont permis d'amplifier un fragment de 200 paires de bases à partir du DNA de la souche pK et de la souche RH. Le séquençage de ce fragment et sa traduction en acides aminés ont montré qu'il correspondait à une partie du gène codant pour la P18. La comparaison de la séquence de 200 pb connue aux banques de données n'a rien donné de convaincant. Jusqu' à présent, aucune molécule de surface chez le toxoplasme n'a montré d'homologie avec des protéines connues.

Il devient possible dès lors, de rechercher le gène complet codant pour la P18, ainsi que ses séquences flanquantes. Ce résultat offre une perspective d'étudier la régulation de la différenciation à l'échelle moléculaire. Il sera nécessaire de déterminer les séquences de régulation gouvernant l'expression de gènes spécifiques de stade, pour envisager une telle étude. Les investigations étaient jusqu'à présent limitées, car aucun gène codant pour des molécules spécifiques de bradyzoïte n'avait été identifié, excepté récemment un gène codant pour une molécule localisée dans la paroi kystique (Parmley *et al* 1994). Une telle étude est donc maintenant envisageable.

I-3. Description des événements survenant au cours de la conversion *in vitro*.

A. Démonstration de l'existence du mécanisme de conversion *in vitro*

Pendant longtemps, il fut considéré que seule la forme proliférative tachyzoïte pouvait se propager en culture *in vitro*, et que l'enkystement sous forme bradyzoïte

survenait *in vivo* lors de la mise en place des défenses immunes de l'hôte. Par la suite, plusieurs auteurs ont décrit plus ou moins précisement des formations kystiques obtenues *in vitro* soit sous l'action d'effecteurs immunologiques comme des anticorps (Shimada *et al*, 1974) ou de l'interféron gamma (Jones *et al*, 1986), soit spontanément avec certaines souches (Dardé *et al*, 1989). Certains (Rondanelli *et al*, 1977) proposèrent même d'en faire un marqueur de virulence, les parasites capables de former des kystes *in vitro* étaient réputés moins virulents. Cependant, la notion de virulence reste un sujet de contreverse car aucune définition claire pour le moment, n'a été proposée. Elle varie selon l'espèce et la race de l'hôte. Une souche virulente chez une espèce peut être avirulente chez une autre, et la corrélation avec le comportement *in vitro* est ainsi peu aisée.

Par l'utilisation des anticorps monoclonaux, nous avons rapidement vérifié l'existence des deux formes proliférative et quiescente *in vitro*. Cela montrait que la conversion de stade pouvait survenir spontanément en culture, ou pouvait suggérer également que ces 2 formes provenaient de deux populations distinctes. Le clonage des parasites montra alors que la conversion était à l'origine de cette hétérogénéité de stades. Notre étude de la conversion spontanée des tachyzoïtes en bradyzoïtes révéla la présence de stades intermédiaires qui confirmaient donc l'existence de cette conversion.

B. Du stade tachyzoïte au stade bradyzoïte

Le processus de conversion du stade tachyzoïte vers le stade bradyzoïte a été analysé, essentiellement dans les conditions que nous avons mis au point afin d'augmenter la fréquence de conversion *in vitro*. Celle survenant spontanément est de fréquence trop basse pour permettre une analyse représentative du processus. On peut s'interroger alors sur la validité de ce modèle, mais la comparaison avec la conversion des tachyzoïtes en bradyzoïtes *in vivo* (Ferguson et al, 1987) a montré une étroite analogie aussi bien sur le plan cinétique que sur les changements morphologiques survenant au cours du processus.

La localisation intracellulaire du parasite dans une vacuole va compliquer l'étude du phénomène. En effet, plusieurs éléments doivent être pris en compte lors de l'analyse de la différenciation: le parasite et le compartiment dans lequel il se

développe. Le parasite qui s'engage dans la voie de différenciation vers le bradyzoïte subit différents niveaux de modifications: modifications d'ordre antigénique et d'ordre morphologique (qui devraient aboutir à la différenciation finale en bradyzoïte) et des modifications du compartiment de survie (de la vacuole parasitophore à la constitution d'un kyste). Nous avons essayé d'étudier ces différents aspects et de les relier entre eux. L'étude en IF et en microscopie électronique ont permis d'aborder ces divers points.

- B.1. Modification de la spécificité antigénique du parasite

L'une des caractéristiques du parasite en cours de conversion vers le bradyzoïte est l'apparition de l'expression de molécules spécifiques de ce stade, et la conservation, au moins dans les premiers temps, de l'expression de molécules majeures du tachyzoïte, en particulier SAG1. L'exintinction de l'expression SAG 1 est plus tardif (vers le sixième jour). Nous avons observé toute une gamme de stades de transition dont les niveaux d'expression des molécules spécifiques de stade en IF varient, reflétant ainsi l'hétérogénéité de réponse des parasites face au stimulus déclencheur de la différenciation.

L'existence de ces stades intermédiaires souligne donc un engagement progressif vers la voie de différenciation bradyzoïte. L'expression séquentielle, c'est à dire décalée dans le temps, des protéines spécifiques de bradyzoïtes (24 à 48 heures pour les P36, P34, et P18, contre 6 jours pour la P21) laisse suggérer une cinétique de la régulation de l'expression de leur gène, et donc un décours complexe de cette voie morphogénétique. Chez les stades intermédiaires, nous ne pouvons pas conclure s'il existe une synthèse simultanée de ces protéines spécifiques de stade, ou si nous sommes en présence d'un phénomène d'exclusion mutuelle, un antigène laissant place à un autre par dilution progressive de son expression. Il sera nécessaire de suivre l'expression des ARN messagers correspondants quand les sondes seront disponibles pour résoudre ce problème.

- B.2. Modification du compartiment: de la vacuole parasitophore au kyste

2-1. Modifications antigéniques:

Dans la vacuole parasitophore en cours de transformation, nous avons observé l'apparition précoce de l'expression d'une protéine de 116 kDa (Weiss *et al*, 1992) ,

ce que nous avons d'ailleurs confirmé en microscopie électronique sur des coupes à congélation. Dès 24 heures, (comme l'expression de la P36) cette protéine s'accumule dans le compartiment ("paroi en formation") dans lequel les parasites évoluent. Elle semble être un composant majeur de la paroi kystique, son marquage étant intense sur des kystes *in vitro* agés de 7 jours. L' espace intra kystique entre les parasites n'est pas marqué. Son origine dans le parasite n'a pas encore été établie, et ne semble pas être les granules denses. Il est possible qu'elle ne s'accumule pas dans un organite particulier, et soit rapidement déversée dans la paroi. Ce type de secrétion n'a pas encore été décrit chez le toxoplasme. Jusqu'à présent, toutes les molécules exocytées connues sont localisées initialement dans des organites.
Récement une protéine de 65 kDa (Parmley *et al*, 1994) a été caractérisée moléculairement, et se situe également dans la paroi des kystes trouvés *in vivo* chez la souris.

Une des caractéristiques du contenu et de la paroi kystique est leur richesse en protéines issues des granules denses (Torpier *et al*, 1994), comme dans le réseau tubulo membranaire dans la vacuole parasitophore contenant les tachyzoïtes.

On peut donc s'interroger sur la fonctionnalité de telles molécules si elles sont présentes dans deux situations aussi distinctes, à moins de conclure à un rôle architectural. La molécule de 116 kDa qui est spécifique du kyste et d'autres récemment identifiées (Weiss *et al* 1992, Parmley *et al* 1994) pourraient donc conférer des propriétes particulière aux kystes par rapport à la vacuole.

2-2. Modifications morphologiques de la vacuole.

Parallèlement à ces changements antigéniques, la vacuole qui s'engage vers la voie de différenciation kystique subit des modifications qui se traduisent d'abord, par l'accumulation d'un matériel dense (la molécule de 116 kDa pourrait en être un composant avec les molécules des granules denses) au niveau de la membrane de la vacuole, témoignant d'une activité secrétrice maintenue. Cette accumulation de matériel dense pourrait expliquer la résistance mécanique du kyste, largement supérieure à celle de la vacuole parasitophore, bien que le kyste soit limité par une unique membrane externe tout comme la vacuole. Les kystes semblent représenter un système plus étanche que la vacuole, à la communication avec l'extérieur (c'est à

dire la cellule hôte). Les observations réalisées *in vivo*, montrent qu'il est totalement silencieux pour les défenses immunes de l'hôte: aucune réaction inflammatoire y est associée (Ferguson and Hutchison, 1987). Des travaux récents (Schwab *et al*: 1994, Beckers *et al*: 1994) ont montré l'existence de pores dans la vacuole parasitophore. Ces pores pourraient assurer les échanges nutritionnels et métaboliques avec la cellule hôte. Leur existence est justifiée par le métabolisme particulièrement actif du tachyzoïte. Leur absence ou la diminution de leur nombre dans la paroi kystique est une hypothèse envisageable, puisque les bradyzoïtes semblent présenter un métabolisme ralenti, impliquant donc des échanges réduits avec la cellule hôte. Nous avons tenté de reproduire les expériences de mise en évidence des molécules parasitaires présentes sur la face externe de la vacuole, dans les conditions décrites par Beckers *et al* (1994) chez les kystes formés *in vitro*. Nous n'avons pas pu conclure définitivement à leur absence, car les traitements infligés aux cellules pour induire la différenciation rendent délicates les expériences de perméabilisations nécessaire à la mise en évidence des pores et compliquent l'interprétation.

L'étude combinée en IF et en microscopie électronique (analyse ultrastructurale et immunodétection) du processus de différenciation a montré que l'expression de molécules spécifiques de bradyzoïte et l'accumulation de matériel dense débutent très précocément, alors qu'aucun changement morphologique visible n'est survenu dans le parasite lui même. Ceci souligne donc l'existence de différents niveaux de différenciation.

– B.3. Maturité des kystes: les stades intermédiaires

La modification morphologique de la vacuole survient précocément avant que ne soient visibles les modifications morphologiques caractéristiques du stade bradyzoïte dans le parasite. La constitution de la paroi kystique peut même se réaliser indépendamment de la modification morphologique du parasite en bradyzoïte. Des structures kystiques semblables aux kystes matures *in vivo* chez la souris sont observées après 4 jours et renferment des parasites aux caractéristiques plus proches du tachyzoïte que du bradyzoïte (parasites peu riches en micronèmes et en grains d'amylopectine) et certains sont en cours d'endodyogènie. Ce type de kyste également rencontré au temps 6 jours, renferme alors des parasites qui n'expriment plus SAG1.

Avec la souche pK, nous sommes cependant parvenus, après 7 jours de culture à obtenir des kystes renfermant des parasites dont les caractéristiques sont proches des bradyzoïtes matures. En effet ces parasites présentent une grande richesse en micronèmes et en grains d'amylopectine. Seules les rhoptries sont encore de type tachyzoïte (aspect non homogène). Ferguson *et al* 1987, ont montré la présence de structures kystiques "immatures", 4 jours après l'arrivée des tachyzoïtes dans le cerveau de la souris infectée. Une quinzaine de jours sera nécessaire pour observer des kystes matures.

Ces divers résultats mettent l'accent sur l'existence de toute une gamme de stade intermédiaires avec des degrés de maturité variés et nous amenent à être prudent dans l'appellation des stades. Le postulat suivant, les tachyzoïtes dans les vacuoles et les bradyzoïtes dans les kystes est donc à utiliser avec prudence.

Cette différenciation progressive semble également exister *in vivo*. Le travail récent de Ferguson (1994) décrivant les kystes de la souche ME49 formés dans le cerveau de souris, en est une illustration. Cette souche est capable d'entraîner ne réactivation spontanée de la toxoplasmose chez une souris chroniquement infectée, Ferguson *et al* corrèlent la réactivation avec la présence de kystes immatures renfermant des parasites ("bradyzoïtes") encore entrain de se multiplier. De tels kystes ne sont jamais (ou très rarement) retrouvés, ou seulement dans les premiers mois de l'infection chronique avec d'autres souches. L'infection chronique n'est donc pas un phénomène figé dans une forme inerte mais soumis à une évolution, au moins chez la souche ME 49. L'existence de stades intermédiaires chez cette souche, pourrait être à l'origine d'un renouvelement de kystes entrainant une certaine instabilité de l'infection chronique, rendant compte du phénomène de réactivation spontanée.

Il semble que le stade ultime de la différenciation soit un arrêt total de croissance et de multiplication du parasite. Mais avant d'y parvenir aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*, le parasite passe par des stades n'exprimant plus de protéines de tachyzoïte et se multipliant à un rythme plus lent. Cette extinction de multiplication est – elle une conséquence inéluctable lors de l'engagement dans la voie de différenciation vers le stade bradyzoïte, et donc serait inscrite d'emblée dans le

programme de différenciation ? Ou bien au contraire, est – elle dépendante du maintien d'une stimulation extérieure ? *In vivo*, aucune augmentation du nombre de kystes est rapportée au cours de l'infection chronique. Il semblerait donc exister un effecteur capable de contrôler l'état de quiescence des kystes *in vivo*, bien qu'aucune réaction inflammatoire ne soit détectée à proximité des kystes. *In vitro* les kystes obtenus en milieu pH 8 éclatent spontanément après 6 ou 7 jours, et les parasites libérés reforment de nouveaux kystes. Cependant, les kystes obtenus *in vitro*, n'ont peut être pas atteint un niveau de maturité assez élevé pour présenter un arrêt complet de leur développement et ne sont peut être pas assez avancés dans le programme de différenciation bradyzoïte pour parvenir jusqu'au stade ultime de la différenciation.

C. Le retour vers la forme proliférative:

Ces diverses observations nous amènent à nous interroger sur le problème de la réversibilité du mécanisme de différenciation.

Quand un parasite s'engage dans la voie de différenciation bradyzoïte, peut il revenir en arrière c'est à dire à la programmation tachyzoïte, ou est – ce un processus irreversible dès son initiation ? Existe t – il dans la kystogénèse un point de non retour où le kyste est condamné à rester définitivement sous forme quiescente, jusqu'à une rupture éventuelle ?

Les expériences de mise en culture de bradyzoïtes libérés des kystes, ont montré que les bradyzoïtes se transformaient rapidement du tachyzoïte (en 48 heures) en passant par un stade intermédiaire. Un temps de latence de 24 heures leur est cependant nécessaire avant d'observer les premières divisions parasitaires, contrairement aux tachyzoïtes qui peuvent se multiplier immédiatement après invasion de la cellule hôte. Une faible partie de l'inoculum est capable de demeurer sous forme bradyzoïte et de s'y multiplier, compliquant donc encore l'interprétation. La question qui se pose à présent est: le bradyzoïte (puisqu'il peut retourner spontanément vers la forme tachyzoïte) doit – il obligatoirement se retrouver libéré hors du kyste pour amorcer le processus de différenciation vers la forme tachyzoïte ? Le retour à la forme tachyzoïte peut – il être initié déjà à l'intérieur du kyste ? Les observations des structures kystiques *in vitro* peuvent apporter des élements de réponse. Lorsque les

parasites se sont engagés dans la voie différenciation bradyzoïte lors d'un traitement pH8 à un stade où l'on commence à obtenir l'extinction de l'expression de SAG1, il est possible d'observer, si l'on supprime le traitement (où si il survient une chute de pH) par la suite, des structures contenant des parasites réexprimant SAG1 à côté de parasites exprimant encore exclusivement les protéines spécifiques de bradyzoïtes. Le retour à la forme tachyzoïte pourrait se déclencher à l'intérieur des "kystes". Cependant il n'est pas possible de conclure définitivement, car nous avons affaire à des kystes obtenus *in vitro*, non encore complétement matures. Ceci met donc l'accent sur l'importance de l'existence de ces stades intermédiaires responsables d'un état de transition instable qui pourrait basculer ves l'un ou l'autre stade (stade proliératif ou stade quiescent). Le phénomène semble donc réversible au moins dans les stades précoces, la sortie des parasites pourrait être nécessaire pour les stades les plus matures.

Lorsque les bradyzoïtes sont mis en culture, ces derniers se retrouvent dans un environnement où la pression immune n'existe pas, pouvant en fait mimer les conditions rencontrées lorsqu'une immunodépression est provoquée chez une souris chroniquement infectée. L'immunodépression (Suzuki *et al* 1989, Gazzinelli *et al* 1992, Watanabe *et al* 1993) semble déclencher la rupture des kystes, et entraîne une prolifération des parasite sous forme tachyzoïte ainsi qu'une augmentation du nombre de kystes. Le mécanisme responsable de l'enkystement (formation de bradyzoïte) peut donc être dissocié de celui permettant de contenir l'infection chronique (prévention de la rupture des kystes). Une immunodépression entraine la perte de contrôle de l'infection chronique (rupture des kystes), la capacité du parasite à former des kystes est cependant conservée. L'immunité aurait un rôle prépondérant dans la stabilité de l'infection chronique. On peut également penser que l'immunodépression n'est pas assez sévère pour affecter le (ou les) facteur(s) immunologique(s) responsable(s) de la formation des kystes.

Suzuki *et al* (1988) ont montré que l'IFN gamma jouait un rôle prépondérant dans la rupture des kystes: un traitement par des anticorps anti IFN gamma entraine une réactivation. On peut s'interroger sur les événements ou éléments responsables de la réactivation. La réactivation pourrait être la conséquence d'une reprise d'activité des parasites (reprise de croissance des parasites) dans les kystes les plus matures (les

kystes " silencieux"), provoquant donc l'éclatement des kystes. L'interféron gamma connu pour inhiber la croissance des tachyzoïtes (Pfefferkorn, 1984) pourrait également intervenir dans l'arrêt de multiplication des bradyzoïtes. L'autre alternative est que l'immunodépression soit responsable directement de la rupture des kystes (bien que ce soit difficile à expliquer), les parasites libérés en absence de pression immune se multiplieraient sous forme tachyzoïte ou bradyzoïte. Il semble donc exister un effecteur produit en permanence ou périodiquement (IFN gamma ou autres) assurant la dormance des kystes. Le fait que les formes intermédiaires pourraient continuer de croître jusqu'à éclatement de la cellule hôte expliquerait ainsi la rupture des "kystes" observée parfois *in vivo* (Ferguson *et al*, 1989) et permettrait une stimulation périodique de la réponse immune responsable de la présence d'un tel effecteur.

II. Induction expérimentale de la conversion *in vitro*

II.1. Facteurs susceptibles d'influencer la conversion

a) La souche de toxoplasme

Les différences souches de Toxoplasme peuvent présenter des comportements distincts dans leur capacité à s'engager spontanément dans la voie de différenciation bradyzoïte. Cette expression spontanée varie selon les souches. Cependant nous avons montré que même la souche RH est capable d'exprimer des protéines de bradyzoïtes. Cette dernière est décrite comme incapable d'entraîner la formation de kystes chez la souris, ainsi qu' *in vitro* spontanément. Cependant elle est susceptible de le faire chez le rat (Lecomte *et al* 1992), ou chez la souris après immunisation (Yano and Nakabayashi, 1984), ou *in vitro* après traitement par du complément et du sérum anti toxoplasmique (Shimada *et al* 1974). La multiplication rapide des tachyzoïtes en particulier pour les souches très virulentes pourrait masquer la capacité de telles souches à exprimer les caractéristiques du bradyzoïte *in vitro*. L'expression bradyzoïte peut donc être retrouvée plus fréquement chez les souches dont les tachyzoïtes se multiplient plus lentement. Ces différences de comportement pourraient également révéler un seuil de sensibilité, plus ou moins élevé, aux stimuli déclencheurs de la conversion, selon les souches. Certaines y seraient très sensibles, d'autres plutôt résistantes. La transformation "spontanée" du stade tachyzoïte vers le

stade bradyzoïte et son expression *in vitro*, traduirait une balance entre la capacité pour une souche de se transformer, et le taux de multiplication des tachyzoïtes.

La susceptibilité aux inducteurs de différenciation varie selon les souches, le niveau de maturité des kystes formés également. En effet, *in vitro*, nous avons observé des différences aussi bien morphologiques qu'antigéniques. Les kystes obtenus avec la souche RH sont relativement peu "matures": ils renferment des parasites n'exprimant jamais la protéine P21, et présentant une organisation morphologique encore proche du tachyzoïte. Les kystes de la souche PK, par contre contiennent des parasites qui sont capables d'exprimer la P21 dès le sixième jour et présentent une maturité plus avancée (pour un même temps de culture), les parasites possédent une plus grande richesse en micronèmes et en grains d'amylopectine. La protéine p21, spécifique du stade bradyzoïte et, qui apparaît plus tardivement que les 3 autres (P36, P34, et P18) lors de la conversion pourrait être un marqueur de maturité du kyste.

La formation spontanée de "bradyzoïte" *in vitro* ne traduit peut être pas une capacité naturelle du parasite, mais serait en fait liée à la culture qui est un environnement inhabituel pour le parasite. Nous n'avons jamais observé la présence de bradyzoïtes dans le péritoïne de souris infectées. La culture pourrait représenter des conditions défavorables voire stressantes pour le développement du parasite.

b) Le parasite

Des différences dans l'état physiologique des cellules hôtes (stade du cycle cellulaire) pouvaient expliquer que seule une partie de la population parasitaire exprime des protéines de bradyzoïtes. Mais l'observation fréquente de stades différents au sein d'une même cellule hôte et même au sein d'une vacuole parasitophore va à l'encontre de cette explication. En effet, les parasites se trouvent à priori dans des conditions environnementales identiques. Le mécanisme est de toute évidence plus subtil et fait appel à des réponses individuelles de chaque parasite lorsque celui ci est confronté aux stimuli déclencheurs de la différenciation. Le seuil de sensibilité permettant de basculer vers un autre stade est donc variable selon la souche et selon le parasite.

A ce stade de l'étude, il n'était pas clair si ce phénomène de conversion spontanée était un processus stable ou plutôt un processus dynamique soumis à des influences

extérieures. Nous avons donc tenté de le moduler *in vitro*.

II.2. Les voies d'induction:

Nos tentatives d'induction expérimentale de la différenciation des tachyzoïtes en bradyzoïtes ont essayé d'apporter des élements de réponse à la compréhension du mécanisme. Le phénomène de conversion spontanée et les travaux antérieurs ont montré que les facteurs immunologiques n'étaient pas nécessaires à la formation de kystes *in vitro* (Jones *et al* 1986, Dardé *et al* 1989). Les divers systèmes que nous avons mis au point: augmentation du pH du milieu de culture à 8, ou de la température d'incubation (traitement de 2 jours à 43°C), ou encore un traitement par l'arsenite de sodium augmentent le nombre relatif de parasites exprimant des protéines de bradyzoïtes.

1. Le pH: facteur possible d'induction de la différenciation

Le pH est capable de déclencher un changement dans l'expression génique chez les plusieurs organismes unicellulaires à la fois chez les eucaryotes et les procaryotes: comme chez les Leihmanies ou les microorganismes. Chez les amibes (*Dictyoselium discoideum*), la sporulation qui est une forme de résistance peut être provoquée par une augmentation de pH (Town *et al*, 1987). Chez les Leshmanies, une acidification des conditions de culture (modification du pH extracellulaire) amène le promastigote à se différencier en amastigote (Zilberstein and Dwyer, 1984), retrouvant en fait les conditions acides du phagolysosomes dans le macrophage. Cependant, on ne sait pas si le pH déclenche un changement de l'expression génique en agissant de l'extérieur seulement, ou s'il induit des modifications du pH intracellulaire. Pour le toxoplasme, entre la modification du pH extracellulaire et le parasite, deux composantes interviennent: la cellule hôte et la vacuole parasitophore. Les mécanismes mis en jeu entre la variation de pH et la réponse du parasite restent à être élucidés.

2. le rôle de la température et des protéines de stress

Ces divers traitements (variation de pH, de température, ...) suggérent que le stress engendré par ces traitements soit à l'origine du déclenchement de la

différenciation *in vitro* qui pourrait ainsi être la réponse du parasite face à une situation de stress.

Le milieu pH 8 pourrait induire un stress par son action toxique: en raison de la forte concentration de bicarbonate de sodium qu'il renferme, combinée à l'utilisation du tampon Hépès, tampon connu pour son effet toxique possible sur les cellules en culture.

La réponse type "Heat shock" est un mécanisme permettant une reprogrammation génique face à un changement d'environnement, ce qui est compatible avec l'induction d'un processus de différenciation faisant appel à l'activation de nouveaux gènes et la répression d'autres.

Chez les parasites, le choc thermique est un effecteur possible de différenciation.

- Chez *Giardia lambia*, l'enkystement conduit à l'expression d'antigènes appartenant à la famille des protéines de stress (Reiner *et al* 1992).

De nombreux microorganismes sont exposés à des variations de température au cours de leur cycle de vie, en particulier les parasites qui possédent des hôtes multiples à température différentes.

- Chez le trypanosome, la forme promastigote retrouvée dans la circulation sanguine de l'hôte mammifère peut se différencier *in vitro* en forme infectieuse métacyclique (forme retrouvée dans l'insecte vecteur) lorsqu'une baisse de la température de la culture est provoquée (Bass and Wang 1992), mimant en fait les conditions de transmission du parasite de l'hôte mammifère (37°C) à l'insecte vecteur (26°C).

- Les Leishmanies présentent deux stades distincts morphologiquement dont l'un réside dans la glande salivaire de l'hôte vecteur poikilotherme à 25°C. Dès que celui ci pénètre dans l'hôte mammifère, il doit se différencier avec succès en forme amastigote, cette différenciation peut être réalisée *in vitro* par une variation de température de 24 à 34°C (Hunter *et al* 1984). Ce processus de différenciation s'accompagne de la synthèse de protéines correspondant à des protéines de choc thermique (Hunter *et al* 1984, Lawrence and Robert - Gero 1985).

- Une relation similaire existe entre l'induction de protéines de choc thermique et le stade parasitaire chez *Trypanosome brucei*. Des RNA messagers homologues

aux HSP70 et HSP83 des cellules eucaryotes sont 25 à 100 fois plus abondants dans la forme trypomastigote retrouvée dans la circulation sanguine de l'hôte mammifère que dans la forme procyclique de l'insecte vecteur (Van der Ploeg *et al*, 1985).

– Chez *Brugia phalangi*, il semble exister un rôle entre l'expression de protéines de choc thermique de bas moléculaire et le développement de la filaire (Devaney *et al* 1992): la microfilaire à 37°C dans la circulation sanguine du mammifère synthétise des HSP de bas poids moléculaire et se trouve dans un état non réplicatif. Lors du passage chez le moustique (28°C), le développement reprend. La réinitiation du développement coïncide avec la repression de la synthèse des HSP de bas poids moléculaire.

L'expression de HSP, notamment HSp27 pourrait être corrélée avec l'état de prolifération ou de différenciation des tissus dans lesquels elle est exprimée. Certaines cellules bloquées en phase S/G2 semblent accumuler ce type de protéines (Pauli *et al*: 1990, Gaestel *et al*: 1989). Donc l'accumulation de telles protéines pourrait entraîner un ralentissement de la réplication. Les bradyzoïtes qui sont une forme latente, peu réplicative pourraient produire ce genre de protéines. Les HSp de bas poids moléculaire auraient un rôle de molécules chaperones (Jakob *et al*, 1993) et permettraient donc aux cellules de résister face à une situation de stress.
Cependant il reste à définir si ce genre de HSP est effectivement synthétisé lors de la transition tachyzoïte / bradyzoïte, si elles ont un rôle direct dans le déclenchement de la différenciation ou si elles sont une conséquence du changement d'état du parasite. Jusqu'à présent, leur intervention dans le mécanisme d'interconversion entre stade chez *Toxoplasma gondii* n'est pas encore démontrée ! Mêmes dans les exemples cités précédemment, nous ne savons pas si les protéines de choc thermique font partie intégrante du processus de différenciation, ou si elles représentent un épiphénomène impliqué dans l'adaptation du parasite à un nouvel environnement et à de nouvelles conditions de vie.

Le système nerveux central peut être le siège de l'accumulation de protéines de stress lorsqu'il subit un dommage cellulaire (Tytell *et al* 1993). Un processus inflammatoire peut déclencher une réponse de ce type. Des cytokines , notamment Il–1, Il–2, les interférons ou et le TNF alpha sont capables d'induire la synthèse de telles protéines (Polla *et al* 1993), les macrophages activés également par la

génération de radicaux oxygénés (Courgeon *et al* 1988). Donc la réaction inflammatoire déclenchée lors de l'infection du toxoplasme dans le cerveau pourrait être impliquée dans le processus de différenciation en bradyzoïte. *In vivo*, le rôle de l'immunité dans le processus de différenciation n'est pas clair, bien que l'IFN gamma soit décrit comme le médiateur majeur de résistance contre le toxoplasme chez la souris (Suzuki *et al* 1988). Il se pourrait que le milieu à pH8 ou le passage à 43°C ou le traitement par l'arsenite de sodium mime l'action d'effecteurs immunologiques intervenant *in vivo*.

3. Une autre hypothèse: le monoxyde d'azote (NO) et l'inhibition de la chaîne respiratoire mitochondriale.

– Rôle du NO *in vitro*

Bohne *et al* (1994) ont développé récemment un modèle de production de bradyzoïtes *in vitro*. Ils montrent que des macrophages de moëlle de souris activés par du LPS et de l'IFN gamma sont capables d'induire l'expression de protéines spécifiques de bradyzoïtes, mais que des fibroblastes humains activés par l'IFN gamma ne le sont pas. Ces derniers résultats sont en accord avec ce que nous avions nous même observé. L'IFN gamma posséde différents modes d'action selon le type cellulaire impliqué. En fibroblastes humains, l'IFN gamma inhibe la croissance du parasite par déplétion du tryptophane (Pfefferkorn *et al*, 1986). Dans les entérocytes et les cellules endothéliales, l'inhibition de croissance déclenchée par l'IFN gamma serait liée à une restriction intracellulaire du fer (Dimier and Bout, 1993). Dans les macrophages activés, l'IFN gamma entraîne la formation de NO (Adams *et al*, 1990). L'hypothèse proposée par ces auteurs, est que la formation de NO serait responsable du déclenchement de la conversion en bradyzoïtes. La chaîne respiratoire mitochondriale pourrait être une cible potentielle, car NO est capable de provoquer son inhibition. A cause de son affinité pour les enzyme à fer et à soufre, NO est capable d'inactiver les complexes I et II de la chaîne de transport des électrons (Bruhwyler *et al*: 1993, Bolanos *et al*: 1994, Oswald *et al*: 1994). La confirmation du rôle de NO est apportée par l'utilisation d'inhibiteurs de la chaîne respiratoire (oligomycine, antimycine), ou des donneurs chimiques de NO (Nitroprussiate de sodium) qui sont capables d'augmenter l'expression de protéines de bradyzoïtes *in*

vitro (Bohne *et al*, 1994). Ces auteurs ont montré également que la cible était la mitochondrie du parasite et non celle de la cellule hôte, car des cellules mutées au niveau de leur DNA mitochondrial ne permettent pas une meilleure induction de l'expression des protéines spécifiques de bradyzoïte, comparée aux cellules mères.

– NO et le cerveau

L'interféron gamma est décrit comme le facteur majeur de résistance à la toxoplasmose chez la souris. Il interviendrait dans le contrôle de l'infection aigue (Johnson 1993, 1992), dans le contrôle d'une réinfection (Gazzinelli *et al*, 1991) et dans le contrôle de la réactivation (Suzuki *et al*; 1989b, Gazzinelli *et al*; 1992a). Gazzinelli et col. (1993a) ont montré qu'un traitement avec des anti IFN gamma entraîne une diminution de l'induction de la NO synthétase (enzyme responsable de la formation de NO) dans le cerveau de souris infectées et déclenche de ce fait une toxoplasmose cérébrale par réactivation de l'infection. NO serait donc un des effecteurs possibles intervenant dans le contrôle de l'infection chronique.

Dans le cerveau, les cellules microgliales possédent une NO synthétase inductible (Bruhwyler *et al*, 1993), les astrocytes une NOS inductible et constitutive (Simmons and Murphy, 1992). Les activités NOS peuvent être induites par des cytokines (Oswald *et al*, 1994). En effet, les macrophages activés par du LPS et de l'IFN gamma en association avec le TNF (Langermans *et al*, 1992) sont capables de produire NO pendant plusieurs jours. NO est une petite molécule de nature lipophile, capable donc de traverser facilement les membranes et peut donc agir sur des cellules cibles voisines par voie paracrine. Sa demi – vie est cependant courte (Hibb *et al*, 1988). Le NO produit lors de la mise en place de l'immunité contre le toxoplasme pourrait être un des médiateurs du déclenchement du processus de différenciation.

– Des mutants résistants à l'Atovaquone

Des mutants de la souche pK ont été sélectionnés pour leur plus grande résistance à une drogue, l'atovaquone; ces mutant expriment plus facilement du bradyzoïte en culture que la souche sauvage (Tomavo, communication personnelle). L'atovaquone est une drogue active contre le toxoplasme (Araujo *et al*, 1991, 1992, 1993). Chez le *Plasmodium*, son site d'action est la chaîne de transport d'électron mitochondriale du parasite (Hudson *et al*, 1991). Le déclenchement de la

différenciation en bradyzoïte pourrait être un moyen pour le parasite de résister aux inhibiteurs de la chaine respiratoire mitochondriale, et donc une mutation affectant la voie métabolique mitochondriale, rendant le parasite moins sensible aux drogues actives sur cette voie favoriserait l'expression du stade bradyzoïte chez de tels parasites.

Tous ces résultats convergent donc vers l'implication de la chaine respiratoire mitochondriale dans le mécanisme de conversion. Les bradyzoïte pourraient être moins dépendants du métabolisme de la chaîne respiratoire mitochondriale que les tachyzoïtes.

Cependant il est encore difficile d'extrapoler ces résultats avec ce qui se passe chez l'homme. En effet, il n'y a pas encore de démonstration claire d'une activité NOS inductible dans les macrophages humains. Cependant une molécule différente de NO mais avec les mêmes fonctions pourrait prendre le relais chez l'homme.

Les inhibiteurs de la chaine respiratoire mitochondriale sont connus pour entrainer une réponse type Heat Shock et générer la production d'intermédiaires dérivés de l'oxygène. Ceci pourrait être le lien entre nos systèmes d'induction de la différenciation (hypothèse du stress) et l'inhibition de la chaîne respiratoire.

- Influence de l'inhibition de la réplication du parasite sur la conversion

Bohne *et al* (1994) affirment qu'une diminution de la multiplication du parasite est nécessaire à l'induction de l'expression d'antigènes spécifiques de bradyzoïtes. Nous avons nous même observé que la différenciation vers la forme bradyzoïte s'accompagne d'une croissance ralentie des parasites. Il est peut être hasardeux d'avancer que le ralentissement de la réplication est un facteur nécessaire au phénomène. Nos expériences comparant l'efficacité relative du milieu pH 8 et les inhibiteurs mitochondriaux tendent à dissocier les deux effets.

Le traitement pH 8 bien que provoquant une forte diminution de la parasitémie permet une conversion (définie par l'expression de protéines spécifiques de bradyzoïte) pratiquement totale des parasites survivants et s'accompagne d'une diminution du taux de réplication. Les inhibiteurs moins efficaces à déclencher la différenciation entrainent une plus forte diminution de la multiplication. Par ailleurs, les parasites qui ne se sont pas engagés dans la voie de différenciation bradyzoïte présentent également une diminution de multiplication quasi comparable à celle des parasites différenciés. Ainsi

l'inhibition de la réplication ne semble pas être responsable de la conversion de stade. Celle - ci pourrait être une conséquence de l'induction de la différenciation vers la voie bradyzoïte, stade qui posséde un métabolisme réduit, avec un ralentissement du rythme de multiplication.
Les souches à taux de multiplication rapide, qui souvent sont très virulentes pour la souris ne forment pas de kystes. La non formation de kystes chez la souris est due soit à leur incapacité naturelle d'en former, soit à la mort trop rapide des souris empêchant donc leur formation. Le débat reste ouvert. Cependant *in vitro*, ces souches ont un taux de conversion spontanée assez bas et sont moins sensibles aux inducteurs de la différenciation (Gross and Bohne, 1994). Si effectivement, l'inhibition de la réplication est nécessaire à l'induction de la différenciation, ceci pourrait expliquer la plus grande difficulté à convertir de telles souches vers la voie bradyzoïte, puisqu'elles ont un taux de croissance supérieur aux autres. Cependant ces souches présentent un métabolisme particulièrement actif leur permettant de surmonter plus facilement des situations défavorables pour leur développement (inhibition de la chaine respiratoire mitochondriale ou stress) et sont sans doute mieux armées pour éliminer toute substance toxique grâce à un catabolisme plus rapide. D'autes souches avec un métabolisme moins actif seraient plus sensibles. Leur engagement plus rapide dans la voie de différenciation bradyzoïte serait un moyen d'échapper à de telles conditions et de s'en protéger. Chose surprenante, une souche particulièrement virulente pour la souris à taux de croissance très rapide, pratiquement insensible au traitement pH 8 (continuant de se multiplier sous forme tachyzoïte, avec un taux de différenciation très bas) ne supporte pas le traitement thermique: les parasites meurent, aucune conversion ne se produit. Ceci laisse suggérer que la différenciation en bradyzoïte en cas d'augmentation de température est un moyen de défense contre une situation critique, et la souche qui ne posséde pas la capacité de se différencier meurt.

Que ce soit la réponse à un stress ou à l'inhibition de la chaine respiratoire mitochondriale, l'engagement dans la voie de différenciation bradyzoïte est un moyen pour le parasite d'assurer sa pérénnité. L'enkystement sous forme bradyzoïte pourrait être la réponse du parasite confronté à une situation de stress provoquée par la machinerie immunologique. L'enkystement est un moyen pour le parasite d'échapper

à la réaction de défense de l'hôte et permettrait d'assurer sa survie dans un environnement hostile, attendant des conditions plus favorables pour se multiplier sous forme tachyzoïte lors d'une levée de la pression immune par exemple.

CONCLUSIONS et perspectives

Les anticorps monoclonaux spécifiques de stade ont permis d'étudier *in vitro* la différenciation, celle se déroulant spontanément et celle induite par divers effecteurs pouvant mimer les conditions rencontrées par les parasites dans l'hôte lors du développement de la réponse immune. Les résultats obtenus par nous et par d'autres, ont montré que des altérations métaboliques du couple parasite – cellule hôte pourraient initier la conversion tachyzoïte – bradyzoïte. La chaîne respiratoire mitochondriale du parasite a été désignée comme cible potentielle des facteurs de différenciation, bien que l'hypothèse du stress dans le déclenchement du mécanisme de conversion ne soit pas écartée. De plus, il est vraisemblable que l'oxyde d'azote soit le médiateur de la conversion *in vivo*. Il est nécessaire à présent de confirmer ces hypothèses en identifiant les voies de signalisation qui dans le parasite, conduisent à l'activation des gènes spécifiques de stade et de comprendre comment l'altération métabolique est traduite en modification de l'expression des gènes.

Indépendamment du thème de différenciation, mais ouvrant de larges perspectives dans ce domaine, la mise au point des techniques de transfection chez *Toxoplasma gondii* (Soldati *et al* 1993, Kim *et al* 1994) a permis un progrès considérable dans la génétique moléculaire de ce parasite. Ces techniques permettent d'envisager l'étude des fonctions de gène par leur suppression ou encore l'analyse fine des séquences régulatrices de leur expression. Il devient donc possible dès qu'un gène spécifique du stade bradyzoïte est cloné d'analyser la régulation de la différenciation au niveau moléculaire, en utilisant les méthodes d'induction de la différenciation développées *in vitro*.

Ces divers méthodes ont permis de produire *in vitro* des parasites exprimant des protéines de bradyzoïtes. Une protéine de 18 kDa a pu être purifiée. La connaissance d'une partie de la séquence en acides aminés de cette molécule a permis d'identifier un fragment du gène. Ce fragment va nous permettre de cloner le gène en entier et de rechercher les séquences flanquantes régulatrices. La connaissance de ces séquences sera exploitée pour l'étude de la régulation de l'expression du gène au cours du processus de différenciation.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Achbarou, A., Mercereaupuijalon, O., Autheman, J.M., Fortier, B., Camus, D., Dubremetz, J.F. (1991). Characterization of Microneme Proteins of *Toxoplasma gondii*. Molecular And Biochemical Parasitology, 47(2): 223-233

Achbarou, A., Mercereaupuijalon, 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(dec): 321-329

Adams, L.B., Hibbs, J.B., Taintor, R.R., Krahenbuhl, J.L. (1990). Microbiostatic Effect of Murine-Activated Macrophages for *Toxoplasma gondii* - Role for Synthesis of Inorganic Nitrogen Oxides from L-Arginine. Journal of Immunology, 144(7): 2725-2729

Ambroise - Thomas, P., and Pelloux H. (1993a). La toxoplasmose et sa pathologie. Med. Mal. Infect. 23 Spécial: 121-128

Ambroise - Thomas, P; and Pelloux, H. (1993b). Toxoplasmosis congenital and in immunocompromised patients: a parallel. Parasitology Today, 9: 61-63

Araujo, F.G., Lin, T., Remington, J.S. (1993). The activitiy of atovaquone (566C80) in murine toxoplasmosis is markedly augmented when used pyrimethamine or sulfadiazine. Journal of Infectious Diseases, 167: 494-497

Araujo, F.G., Huskinson - Mark, J., Gutteridge, W.E., Remington, J.S. (1992). *In vitro* and *in vivo* activities of the hydroxynaphtoquinone 566C80 against cyst form of *Toxoplasma gondii*. Antimicrobial Agents Chemotherapies, 36: 326-330

Araujo, F.G., Huskinson, J., Remington, J.S. (1991b). Remarkable *in vitro* and *in vivo* activities of the hydroxynaphtoquinone 566C80 against tachyzoïtes and cysts of *Toxoplasma gondii*. Antimicrobial Agents Chemotherapies, 35: 293-299

Araujo, F.G. (1991a). Depletion of L3T4+ (CD4+) Lymphocytes-T Prevents Development of Resistance to *Toxoplasma gondii* in Mice. Infection And Immunity, 59(5): 1614-1619 Tg

Bancroft, G.J., Sheehan, K.C., Schreiber R.D., Unanue E.R. (1989). Tumor necrosis factor is involved in the T-cell-independaent pathway of macrophage activation in SCID mice. Journal of Immunology, 143: 127-130

Bass, K., and Wang, C. (1992). Transient inhibition of protein synthesis accompanies differentiation of *Trypanosoma brucei* from bloodstream to procyclic forms. Molecular and Biochemical Parasitology, 56: 129-140

Beckers, C.J.M., Dubremetz, J.F., Mercereaupuijalon, O., Joiner, K.A. (1994). The *Toxoplasma gondii* rhoptry protein ROP 2 is inserted into the parasitophorous vacuole membrane, surrounding the intracellular parasite, and is exposed to the host cell cytoplasm. Journal of Cell Biology, 127(4): 947-961

Black, C.M., Catterall, J.R., Remington, J.S. (1987). *In vivo* and *in vitro* activation of alveolar macrophages by recombinant interferon gamma. Journal of Immunology, 138: 491-495

Bloch - Michel, E., Couvreur, J. et al. (1992). Toxoplasmose occulaire. Encycl. Med. Chir. 21230 B18

Bohne, W., Gross, U., Heesemann, J. (1993). Differentiation Between Mouse-Virulent and Mouse-Avirulent Strains of *Toxoplasma gondii* by a Monoclonal Antibody Recognizing a 27-Kilodalton Antigen. Journal Of Clinical Microbiology 31(6): 1641-1643

Bohne, W., Heesemann, J., Gross, U. (1993). Induction of Bradyzoite-Specific *Toxoplasma gondii* Antigens in Gamma-Interferon-Treated Mouse Macrophages. Infection And Immunity, 61(3): 1141-1145

Bohne, W., Heesemann, J., Gross, U. (1993). Coexistence of Heterogeneous Populations of *Toxoplasma gondii* Parasites Within Parasitophorous Vacuoles of Murine Macrophages as Revealed by a Bradyzoite-Specific Monoclonal Antibody. Parasitology Research, 79(6): 485-487

Bohne, W., Heesemann, J., Gross, U. (1994). Reduced Replication of *Toxoplasma gondii* Is Necessary for Induction of Bradyzoite-Specific Antigens - A Possible Role for Nitric Oxide in Triggering Stage Conversion. Infection And Immunity, 62(5): 1761-1767

Bolanos, J.P., Peuchen, S., Heales, J.R., Land, J.M., Clark, J.B. (1994). Nitric Oxide - mediated inhibition of the mitochondrial respiratory chain in cultured astrocytes. Journal of Neurochemistry, 63: 910-916

Bonhomme, A., Boulanger, F., Bharadwaj, L.M., Puygauthiertoubas, D., Bonhomme, P., Pluot, M., Pinon, J.M. (1990). *Toxoplasma gondii* - Immunocytochemistry of Four Immunodominant Antigens with Monoclonal Antibodies. Experimental Parasitology, 71(4): 439-451

Brown, C.R., David, C.S., Khare, S.J., Mcleod, R. (1994). Effects of Human Class I Transgenes on *Toxoplasma gondii* Cyst Formation. Journal of Immunology, 152(9): 4537-4541

Brown, C.R., Mcleod, R. (1990). Class-I MHC Genes and CD8+ T-Cells Determine Cyst Number in *Toxoplasma gondii* Infection. Journal of Immunology, 145(10): 3438-3441

Bruhwyler, J., Chleide, E., Liégeois, J.F., Carreer, F. (1993). Nitric Oxide: a new messenger in the brain. Neurosciences and Biobehavioral Reviews, 17: 373-384

Burg, J.L., Grover, C.M., Pouletty, P., Boothroyd, J. (1989). Direct and sensitive detection of a pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii*, by polymerase chain reaction. Journal of Clinical Microbiology, 27: 1787-1792

Burg, J.L., Perelman, D., Kasper, L.H., Ware, P.L., Boothroyd, J.C. (1988). Molecular analysis of the gene encoding the major surface antigen of *Toxoplasma gondii*. Journal of Immunology, 141(10): 3584-3591

Cesbron-Delauw, M.F., Guy, B., Torpier, G., Pierce, R.J., Lenzen, G., Cesbron, J.Y., Charif, H., Lepage, P., Darcy, F., Lecocq, J.P., et, al (1989). Molecular characterization of a 23-kilodalton major antigen secreted by *Toxoplasma gondii*. Proceedings od the National Academy of Sciences of the U S A, 86(19): 7537-7541

Chardès, T., Velge-Roussel, F., Mevelec, P., Mevelec, M.N., Buzony-Gatel, D., Bout, D. (1993). Mucosal and systemic cellular immune responses induced by *Toxoplasma gondii* antigens in cyst orally infected mice. Immunology, 78: 421-429

Charif, H., Darcy, F., Torpier, G., Cesbrondelauw, M.F., Capron, A. (1990). *Toxoplasma gondii*: characterization and localization of antigens secreted from tachyzoites. Experimental Parasitology, 71(1): 114-124

Cornelissen, A.W.C.A., Overdulve, J.P., Hoenderboom, J.M. (1981). Separation of *Isospora (Toxoplasma) gondii* cysts and cystozoites from mouse brain tissue by continuous density-gradient centrifugation. Parasitology, 81: 103-108

Courgeon, A.M., Rollet, E., Becker, J., Maisonhaute, C., Best - Belpomme, M. (1988). Hydrogen peroxyde (H2O2) induces actin and some heat - shock proteins in *Drosophilia* cells. European Journal of Biochemistry, 171: 163-170

Couvreur, G., Sadak, A., Fortier, B., Dubremetz, J.F. (1988). Surface antigens of *Toxoplasma gondii*. Parasitology, 97: 1-10

Darcy, F., Deslee, D., Santoro, F., Charif, H., Auriault, C., Decoster, A., Duquesne, V., Capron, A. (1988). Induction of a protective antibody-dependent response against toxoplasmosis by in vitro excreted/secreted antigens from tachyzoites of *Toxoplasma gondii*. Parasite Immunology, 10(5): 553-567

Dardé, M.L., Bouteille, B., Pestre - Alexandre, M. (1988). Isoenzymatic characterization of seven strains of *Toxoplasma gondii* by isoelectrofocusing in polyacrylamide gels. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 39: 551-558

Dardé, M.L., Bouteille, B., Leboutet, M.J., Loubet, A., Pestre-Alexandre, M. (1989). *Toxoplasma gondii*: ultrastructural study of cystic formations observed in human fibroblast culture. Annales de Parasitologie Humaine et Comparée, 64(6): 403-411

Denkers, E.Y., Gazzinelli, R.T., Hieny, S., Caspar, P., Sher, A. (1993). Bone marrow macrophages process exogenous *Toxoplasma gondii* polypeptides for recognition by parasite - specific cytolytic lymphocytes - T. Journal of Immunology, 150(2): 517-526

Denkers, E.Y., Gazzinelli, R.T., Martin, D., Sher, A. (1993). Emergence of NK1.1+ cells as effectors of IFN - gamma dependent immunity to *Toxoplasma gondii* in MHC class I - deficient mice. Journal of Experimental Medicine, 178(5): 1465-1472

Derouin, F., Sarfati, C., Beauvais, B., Iliou, M.C., Dehen, L., Lariviere, M. (1989). Laboratory diagnosis of pulmonary toxoplasmosis in patients with acquired immunodeficiency syndrome. Journal of Clinical Microbiology, 27(7): 1661-1663

Derouin, F., Garin, Y.J.F. (1991). *Toxoplasma gondii* - blood and issue kinetics during acute and chronic infections in mice. Experimental Parasitology, 73(4): 460-468

Devaney, E., Egan, A., Lewis, E., Warbrick, V., Jecock, R.M. (1992). The expression of small heat shock proteins in the microfilaria of *Brugia pahangi* and their possible role in development. Molecular and Biochemical Parasitology, 56: 209-218

Dimier, I., Bout, D. (1993). Rat intestinal epithelial cell line IEC-6 is activated by recombinant interferon gamma to inhibit replication of the coccidian *Toxoplasma gondii*. European Journal of Immunology, 23(4): 981-983

Dubremetz, J.F., Sadak, A., Taghy, Z., Fortier, B. (1987). Characterization of a 42 KDa rhoptry antigen of *Toxoplasma gondii*. in: Chang, K.-P., Snary, D. (Eds) Host-Parasite cellular and molecular interactions in protozoal infections, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, NATO ASI Series H: Cell Biology, Vol. 11

Dubremetz, J.F., Achbarou, A., Bermudes, D., Joiner, K.A. (1993). Kinetics and pattern of organelle exocytosis during *Toxoplasma gondii* / host-cell interaction. Parasitology Research, 79(5):402-408

Dupouy - Camet, J., Gavinet, M.F., et al. (1993). Mode de contamination, incidence et prévalence de la toxoplasmose. Med. Mal. Infect, 23 spécial: 139-147

Endo, T., Sethi, K.K., Piekarski, G. (1982). *Toxoplasma gondii*: Calcium ionophore A23187-mediated exit of trophozoites from infected murine macrophages. Experimental Parasitology 53: 179-188

Ferguson, D.J.P., Hutchison, W.M. (1987a). An ultrastructural study of the early development and tissue cyst formation of *Toxoplasma gondii* in the brains of mice. Parasitology Research, 73(6): 483-491

Ferguson, D.J.P., Hutchison, W.M. (1987b). The host-parasite relationship of *Toxoplasma gondii* in the brains of chronically infected mice. Virchows Arch A, 411: 39-43

Ferguson, D.J., Hutchison, W.M., Pettersen, E. (1989). Tissue cyst rupture in mice chronically infected with *Toxoplasma gondii*. An immunocytochemical and ultrastructural study. Parasitology Research, 75(8): 599-603

Ferguson, D.J.P., Huskinsonmark, J., Araujo, F.G., Remington, J.S. (1994). A morphological study of chronic cerebral toxoplasmosis in mice: Comparison of four different strains of *Toxoplasma gondii*. Parasitology Research, 80(6): 493-501

Fiorentino, D.F, Zlotnik, T., Mosmann, T., Howard, M., O'Garra, A. (1991). Il-10 inhibits cytokine production by activated macrophage. Journal of Immunology, 147: 3815-3822

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

Foster, B.G., Mc Culloch, W.F. (1968). Studies of active and passive immunity in animals inoculated with *Toxoplasma gondii*. Canadian Journal of Microbiology, 14: 103-110

Foussard, F., Gallois, Y., et al. (1990). Isolation of the pellicule of toxoplasma gondii (Protozoa, Coccidia): characterization by electron microscopy and protein composition. Parasitology Research, 76: 563-565

Foussard, F., Leriche, M.A., Dubremetz, J.F. (1991). Characterization of the lipid content of *Toxoplasma gondii* rhoptries. Parasitology, 102: 1-4

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

Gaestel, M., Gross, B., Benndorf, R., Strauss, M., Schunk, W.H., Kraft, R., Otto, A., Bohm, H., Stahl, J., Drabsch, H., bielka, H. (1989). Molecular cloning, sequencing and expression in *Escherichia coli* of the 25 kDa growth - related protein of Ehrlich ascites tumor and its homology to mammalian stress proteins. European Journal of Biochemistry, 179: 209-213

Gajewski, T.F., Fitch, F. W. (1988). Anti - proliferative effect of IFN gamma in immunoregulation. I. IFN gamma inhibits the proliferation of Th2 but not Th1 murine helper T lymphocyte clones. Journal of Immunology, 140: 4245-4252

Gazzinelli, R.T., Hakim, F.T., Hieny, S., Shearer, G.M., Sher, A. (1991). Synergistic role of CD4+ and CD8+ lymphocytes-T in IFN-gamma production and protective immunity induced by an attenuated *Toxoplasma gondii* vaccine. Journal of Immunology, 146(1): 286-292

Gazzinelli, R., Xu, Y.H., Hieny, S., Cheever, A., Sher, A. (1992a). Simultaneous depletion of CD4+ and CD8+ lymphocytes-T Is required to reactivate chronic infection with *Toxoplasma gondii*. Journal of Immunology, 149(1): 175-180

Gazzinelli, R.T., Hartley, J.W., Fredrickson, T.N., Chattopadhyay, S.K., Sher, A., Morse, H.C. (1992b). Opportunistic infections and retrovirus-induced immunodeficiency - studies of acute and chronic infections with *Toxoplasma gondii* in mice infected with LP-BM5 Murine Leukemia Viruses. Infection and Immunity, 60(10): 4394-4401

Gazzinelli, R.T., Oswald, I.P., James, S.L., and Sher, A. (1992c). IL-10 Inhibits parasite killing and nitrogen oxide production by IFN-gamma-activated macrophages. The Journal of Immunology, 1992, 148(6): 1792-1796.

Gazzinelli, R.T., Eltoum, I., Wynn, T.A., Sher, A. (1993a). Acute cerebral Toxoplasmosis is induced by in vivo neutralization of TNF-alpha and correlates with the down - regulated expression of inducible nitric oxide synthase and other markers of macrophage activation. Journal of Immunology, 151(7): 3672-3681

Gazzinelli, R.T., Hieny, S., Wynn, T.A., Wolf, S., Sher, A. (1993b). Interleukin-12 Is required for the T - lymphocyte - independent induction of interferon-gamma by an intracellular parasite and induces resistance in T - cell - deficient hosts. Proceedings of The National Academy of Sciences of USA, 90(13): 6115-6119

Gazzinelli, R.T., Wysocka, M., Hayashi, S., Denkers, E.Y., Hieny, S., Caspar, P., Trinchieri, G., Sher, A. (1994). Parasite-induced IL-12 stimulates early IFN-gamma synthesis and resistance during acute infection with *Toxoplasma gondii*. Journal of Immunology, 153(6): 2533-2543

Gill, H.S., Prakash, O. (1970). A study on the active and passive immunity in experimental toxoplasmosis. Indian Journal of Medical Research, 58: 1157-1163

Grimwood, B.G., Hechemy, K., Stevens, R.W. (1979). *Toxoplasma gondii*: purification of trophozoïtes propagated in cell culture. Experimental Parasitology, 48: 282-286

Gross, U., Müller, W. A., Knapp, S., and Heesemann, J. (1991). Identification of a virulence-associated antigen of *Toxoplasma gondii* by use of a mouse monoclonal antibody. Infection and Immunity, 59, n° 12: 4511-4516

Gross, U., Bohne, W. (1994). *Toxoplasma gondii*: Strain and host cell - dependent induction of stage differentiation. Journal of Eukaryotic Microbiology, 41(5): S10-S11

Hauser W.E. Jr., Sharma S.D., Remington J.S. (1982) Natural killer cells induced by acute and chronic *Toxoplasma* infection. Cellular Immunology, 69: 330-346

Hauser W.E. Jr, Sharma S.D., Remington J.S. (1983) Augmentation of NK cell activity by soluble and particulate fractions of *Toxoplasma gondii*. Journal of Infectious diseases, 131: 458-463

Hibbs, J.B., Taintor, R.R., Vavrin, Z., Rachlin, E.M. (1988). Nitric Oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. Biochemical and Biophysical Research. Communications, 157: 87-94

Holliman, R.E. (1988). Toxoplasmosis and the acquired immune deficiency syndrome. Journal of Infection, 16: 121-128

Hudson, A.T., Dickins, M., Ginger, C.D., Gutteridge, W.E., Holdish, T., Hutchinson, D.S.A., Pudney, M., Randall, A.W. Latter, V.S. (1991). 566C80: a potent broad spectrum anti - infective agent with activity against malaria and opportunistic infection in AIDS patients. Drugs Experimental Clinical Research, 17: 427-435

Hunter, K. W., Cook, C.L., Hayunga, E.G. (1984). *Leishmania* differentiation *in vitro*: induction of heat shock proteins. Biochemical and Biophysical Research Communications, 125: 755-760

Hutchison, W.M., Dunachie, J.F., Siim, J.C., Work, K. (1970). Coccidian - like nature of *Toxoplasma gondii*. British medical Journal, 1: 142-144

Israelski, D., Remington, J. (1990). Activity of gamma-interferon in combination with pyrimethamine or clindamycin in treatment of murine toxoplasmosis. European Journal Of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 9(5): 358-361

Jakob, U., Gaestel, M., Engels, K., Buchner, J. (1992). Small Heat shock proteins are molecular chaperone. Journal of Biological Chemistry, 268: 1517-1520

Johnson, A.M., McDonald, P.J., Neoh, S.H. (1983). Monoclonal antibodies to *Toxoplasma* cell membrane surface antigens protect mice from toxoplasmosis. Journal of Protozoology, 30: 351-356

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

Johnson, L., Van der Vegt, P., Havell, E. (1993). Gamma interferon - dependent temporary resistance to acute *Toxoplasma gondii* infection independent of CD4+ or CD8+ lymphocytes. Infection and Immunity, 61: 5174-5180

Joiner, K.A., Fuhrman, S.A., Miettinen, H.M., Kasper, L.H., Mellman, I. (1990). *Toxoplasma gondii* - fusion competence of parasitophorous vacuoles in Fc-receptor transfected fibroblasts. Science, 249, (4969): 641-646

Jones, Th.C., Yeh, S., Hirsch, J.G. (1972). The interaction between *Toxoplasma gondii* and mammalian cells. Journal of Experimental Medicine, 136: 1157-1172

Jones, T.C., Bienz, K.A., Erb, P. (1986). In vitro cultivation of *Toxoplasma gondii* cysts in asterocytes in the presence of gamma interferon. Infection and Immunity, 51: 147-156

Kasper, L.H., Bradley, M.S., Pfefferkorn, E.R. (1984). Identification of stage-specific sporozoite antigens of *Toxoplasma gondii* by monoclonal antibodies. Journal of Immunology, 132: 443-449

Kasper, LH., (1987). Isolation and characterization of a monoclonal anti-P30 antibody resistant mutant of *Toxoplasma gondii.* Parasite Immunology, 9: 433-435

Kasper, L.H. (1989). Identification of stage-specific antigens of *Toxoplasma gondii.* Infection And Immunity, 57(3): 668-672

Kasper, L.H., and Kahn, I.A. (1993). Role of P30 in host immunity and pathogenesis of *Toxoplasma gondii* infection, in "48th" forum in Immunology. Research in Immunology, 144: 45-48

Kim, K., Soldati, D., Boothroyd, J. (1993). Gene replacement in *Toxoplasma gondii* with chloramphenicol acetyltransferase as selectable marker. Science, 262: 911-914

Kimata, I., Tanabe, K. (1987). Secretion by *Toxoplasma gondii* of an antigen that appears to become associated with the parasitophorous vacuole membrane upon invasion of the host cell. Journal Of Cell Science, 88 (Pt 2): 231-239

Krahenbul, J.L., Remington, J. (1982). Immunology of *Toxoplasma* and toxoplasmosis. In: Cohen S, Warren KS, eds. Immunology of parasitic infections. London: Blackwell Scientific Publications: 356-421

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

Langermans, J.A.M., Van der Hulst, M.E.B., Nibbering, P.H., Hiemstra, P.S., Fransen, L., Van Furth, R. (1992). Interferon gamma induced L - arginine - dependent toxoplasmastatic activity in murine peritoneal macrophages is mediated by endogenous tumor necrosis factor alpha. Journal of Immunology, 148: 568-574

Lawrence, F., Robert - Gero, M. (1985). Induction of heat shock and stress proteins in promastigotes of three *Leishmania* species. The Proceedings of the National Academiy of Sciences of the U.S.A. 82: 4414-4417

Laywer, P.G., Ngumbi, P.M., Anjill, C.O. et al. (1990). Development of *Leishmania major* in *Phlebotomus duboscqi* and *Sergentomyia scwetzi* (diptera: psychodidae). American Journal Of Tropical Medicine and Hygiene, 43: 31-43

Lecomte, V., Chumpitazi, B.F.F., Pasquier, B., Ambroise - Thomas, P., Santoro, F. (1992). Brain -tissue cysts in rats infected with the RH strain of *Toxoplasma gondii.* Parasitology Research, 78: 267-269

Leport, C., Remington, J.S. (1992). Toxoplasmosis in AIDS. Presse Medicale, 21(25): 1165-1171

Leriche, M.A., Dubremetz, J.F. (1990). Exocytosis of *Toxoplasma gondii* dense granules into the parasitophorous vacuole after host cell invasion. Parasitology Research, 76(7): 559-562

Leriche, M.A., Dubremetz, J.F. (1991). Characterization of the protein contents of rhoptries and dense granules of *Toxoplasma gondii* tachyzoites by subcellular fractionation and monoclonal antibodies. Molecular And Biochemical Parasitology, 45(2): 249-260

Levine, L.D., Corliss, Cox, F.E.G., J.O, Deroux, G., Gran, J., Hongberg, B.M., Leedale, G.F., Loeblich, A.R., Lom, J., Lynn, D., Merinfeld, E.G., Page, F.C., Poljansky, G., Sprague, V., Vavra, J., Wallace, F.G. (1980). A newly revised classification of Protozoa. Journal of Protozoology, 27: 37-58

Lindberg, R.E., Frenkel, J.F. (1977). Toxoplasmosis in nude mice. Journal of Parasitology, 63: 219-221

Luft, B.J., Brooks, R.G., Conley, F.K., McCabe, R.E., Remington J.S. (1984). Toxoplasmic encephalitis in patients with acquired immune response deficiency syndrome. JAMA, 252: 913-917

Luft, B.J., Hafner, R., Korzun, A.H., Leport, C., Vilde, J.L., Remington, J.S. (1993). Toxoplasmic Encephalitis in Patients with the Acquired Immunodeficiency Syndrome. New England Journal of Medicine, 329(14): 995-1000

Lycke, E., Calberg, K., Norrby, R. (1975). Interaction between *Toxoplasma gondii* and its host cell: function of the penetration-enhancing factor of Toxoplasma. Infection and Immunity, 11: 853-861

Masihi, K.N., Werner, H. (1978). The effect of passively transferred heterologous serum on *Toxoplasma gondii* in NMRI mice. Influence of the treatment on course of infection and cyst formation. Zentralbl. Bakteriol. Orig. A 240: 135-142

Mevelec, M.N., Chardes, T., Mercereaupuijalon, 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. Molecular And Biochemical Parasitology, 56(2): 227-238

Morlat, P., Ragnaud, J.M., et al. (1993). La toxoplasmose cérébrale au cours du SIDA. Med. Mal. Infect. 23 Spécial: 183-189

Murray, H.W.B., Rubin, Y., Masur, H., Roberts, R.B. (1984). Impaired production of lymphokine and immune (gamma) interferon in the acquired immunodeficiency syndrome. New English Journal of Medicine, 310: 883

Nagel, S.D., Boothroyd, J.C. (1989). The major surface antigen, P30, of *Toxoplasma gondii* is anchored by a glycolipid. Journal of Biological Chemistry, 264(10): 5569-5574

Nathan, C.F., Murray, H.W., Wiebe, M.E., Rubin, B.Y. (1983). Identification of interferon gamma as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. Journal of Experimental Medicine, 158: 670-689

Navia, B.A., Petito, C.K., Gold, J.W.K., Cho, E.S., Jordan, B.D., Price, R.W. (1986). Cerebral toxoplasmosis complicating the acquired immune deficiency syndrome: clinical and neuropathologic findings in 27 patients. Annals of Neurology, 19: 224-238

Omata, Y., Igarashi, M., Ramos, M.I., Nakabayashi, T. (1989). *Toxoplasma gondii*: antigenic differences between endozoites and cystozoites defined by monoclonal antibodies. Parasitology Research, 75(3): 189-193

Oswald, I., Wynn, A., Sher, A., James, S.L. (1994). NO as an effector molecule of parasite killing: modulation of its synthesis by cytokines. Comparative Biochemistry and Physiology. 108C: 11-18

Parker, S.J., Roberts, C.W., Alexander, J. (1991). CD8+ T-cells are the major lymphocyte subpopulation involved in the protective immune response to *Toxoplasma gondii* in Mice. Clinical And Experimental Immunology, 84(2): 207-212

Parmley, S.F., Yang, S.M., Harth, G., Sibley, L.D., Sucharczuk, A., Remington, J.S. (1994). Molecular characterization of a 65 kilodalton *Toxoplasma gondii* antigen expressed abundantly in the matrix of tissue cysts. Molecular and Biochemical Parasitology, 66(2): 283-296

Pauli, D., Tonka, C.H., Tissieres, A., Arrigo, A.P. (1990). Tissue - specific expression of the heat shock protein hsp27 during *Drosophila melanogaster* developpment. Journal of Cell biology, 111: 817-828

Pavesio, C.E.N., Chiappino, M.L., Setzer, P.Y., Nichols, B.A. (1992). *Toxoplasma gondii* - Differentiation and Death of Bradyzoites. Parasitology Research, 78 (1): 1-9

Pfefferkorn, E.R. (1984). Interferon gamma blocks the growth of *Toxoplasma gondii* in human fibroblasts by inducing the host cells to degrade tryptophan. The Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 81: 908-912

Pfefferkorn, E.R., Pfefferkorn, LC. (1976). *Toxoplasma gondii*: Isolation and preliminary characterization of temperature-Sensitive mutants. Experimental Parasitology, 39(3): 365-376

Pfefferkorn, E.R., Eckel, M., Rebhuhn, S. (1986). Interferon gamma suppresses the growth of *Toxoplasma gondii* in human fibroblasts through starvation for tryptophan. Molecular and Biochemistry Parasitology, 20: 215-225

Polla, B.S., Perin, M., Pizurki, L. (1993). Regulation and functions of stress proteins in allergy and inflammation. Clinical and Experimental Allergy, 23: 548-556

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

Reiner, D. S., Shinnick, T. M., Ardeshi, F., Gillin, F. D. (1992). Encystation of *Giardia lamblia* leads to expression of antigens recognized by antibodies against conserved heat shock proteins. Infection and Immunity, 60: 5312-5315

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

Sadak, A., Taghy, Z., Fortier, B., Dubremetz, J.F. (1988). Characterization of a family of rhoptry proteins of *Toxoplasma gondii.* Molecular And Biochemical Parasitology, 29(2-3): 203-211

Saffer, L.D., Mercereau - Pujalon, O., Dubremetz, J.F., Schwartzman, J.D. (1991). Localisation of *Toxoplasma gondii* rhoptry protein by immunoelectron microscopy during and after host cell penetration. Journal of Protozoology, 39: 526-530

Scharton T.M., Scott, P. (1993). Natural killer cells are a source of IFN gamma that drives differentiation of CD4+ T cell subsets and induces early resistance to *Leishmania major* in mice. Journal of Experimental Medecine, 178: 567-577

Schluter,D., Lohler J., Deckert M., Hof H, Schwendemann G. *Toxoplasma gondii* encephalitis of immunocompetent and nude mice: immunohistochemical characterization of Toxoplasma antigen, infiltrates and major histocompatibility complex gene products. Journal of Neuroimmunology, 31: 185-198

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

Schwab, J.C., Beckers, C.J.M., Joiner, K.A. (1994). The Parasitophorous vacuole membrane surrounding intracellular *Toxoplasma gondii* functions as a molecular sieve. The Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 91(2): 509-513

Senaud, J. (1967). Contribution a l'étude des Sarcosporidies et des Toxoplasmes (Toxoplasma). Protistologica, 3: 167-232

Sharma, S.P., Dubey, J.P. (1981). Quantitative survival of *Toxoplasma gondii* tachyzoites and bradyzoites in pepsin and trypsin solutions. American Journal of Veterinary Research, 42: 128-130

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.* Journal of Immunology, 133: 2818-2820

Shearer, G.M., Bernstein, D.C., Tung, K.S.T, et al. (1986) A model for the selective loss of major histocompatibility complex self-restricted T cell immune responses during the development of acquired immune deficiency syndrome (AIDS). Journal of Immunology, 137: 2514-2521

Sher, A., Oswald, I.P., Hieny, S., Gazzinelli, R.T. (1993). *Toxoplasma gondii* induces a T-independent IFN-gamma response in natural killer cells that requires both adherent accessory cells and tumor Necrosis Factor-alpha. Journal of Immunology 150(9):3982-3989

Shimada, K., MD, Richard O'connor, G., MD, Yoneda, C, MD. (1974). Cyst formation by *Toxoplasma gondii* (RH Strain) in vitro. Arch ophthalmol 92, 496-500

Sibley, L.D., Boothroyd, J.C. (1992). Virulent Strains of *Toxoplasma gondii* Comprise a Single Clonal Lineage. Nature, 359 (6390): 82-85

Sibley, L.D., Niesman, I.R., Asai, T., Takeuchi, T. (1994). *Toxoplasma gondii*: Secretion of a potent nucleoside triphosphate hydrolase into the parasitophorous vacuole. Experimental Parasitology 79(3): 301-311

Simmons, M.L., Murphy, S. (1992). Induction of nitric oxide synthase in glials cells. Journal of Neurochemistry, 59: 897-895

Soldati, D., Boothroyd, J. (1993). Transient transfection and expression in the obligate intracellular parasite *Toxoplasma gondii*. Science, 240: 516-518

Suzuki, Y., Orellana, M. A., Schreiber, R. D., Remington, J. S. (1988). Interferon-: the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. Science, 240: 516-518

Suzuki, Y., Conley, F.K., Remington, J.S. (1989a). Differences in virulence and development of encephalitis during chronic infection vary with the strain of *Toxoplasma gondii*. Journal of Infectious Diseases, 159(4): 790-794

Suzuki, Y., Conley, F.K., Remington, J.S. (1989b). Importance of endogenous IFN-gamma for prevention of toxoplasmic encephalitis in mice. Journal of Immunology, 143: 2045-2050

Suzuki, Y., Conley, F. K., and Remington, J. S. (1990). Treatment of toxoplasmic encephalitis in mice with recombinant gamma interferon. Infection and Immunity, 58, n° 9, 3050-3055

Suzuki, Y., Joh, K., Kabayashi, A. (1991a). Tumor necrosis factor independent protective effect of recombinant IFN gamma against acute toxoplasmosis in T cell deficient mice. Journal of Immunology, 147: 2728-2733

Suzuki, Y., Joh, K., Orellana, M.A., Conley, F.K., Remington, J.S. (1991b). A Gene(s) Within the H-2D Region Determines the Development of Toxoplasmic Encephalitis in Mice. Immunology, 74(4): 732-739

Suzuki, Y., Orellana, M.A., Wong, S.Y., Conley, F.K., Remington, J.S. (1993). Susceptibility to chronic infection with *Toxoplasma gondii* does not correlate with susceptibility to acute infection in mice. Infection And Immunity, 61(6): 2284-2288

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

Suzuki, Y., Joh, K. (1994). Effect of the strain of *Toxoplasma gondii* on the development of toxoplasmic encephalitis in mice treated with antibody to interferon-gamma. Parasitology Research, 80(2): 125-130

Tomavo, S., Schwarz, R.T., Dubremetz, J.F. (1989). Evidence for glycosyl-phosphatidylinositol anchoring of *Toxoplasma gondii* major surface antigens. Molecular and Cellular Biology, 9(10): 4576-4580

Tomavo, S., Fortier, B., Soête, M., Ansel, C., Camus, D., and Dubremetz, J.F. (1991). Characterization of bradyzoite-specific antigens of *Toxoplasma gondii*. Infection and Immunity, 59, 3750-3753

Tomavo, S., Dubremetz, J.F., Schwarz, R.T. (1992). A Family of glycolipids from *Toxoplasma gondii* - identification of candidate glycolipid precursor(s) for

Toxoplasma gondii glycosylphosphatidylinositol membrane anchors. Journal of Biological Chemistry, 267(17): 11721-11728

Tomavo, S., Dubremetz, J.F., Schwarz, R.T. (1993). Structural analysis of glycosyl-phosphatidylinositol membrane anchor of the *Toxoplasma gondii* tachyzoite surface glycoprotein gp23. Biology of the Cell, 78(3): 155-162

Tomavo, S., Couvreur, G., Leriche, M.A., Sadak, A., Achbarou, A.A., Fortier, B., Dubremetz, J.F. (1994). Immunolocalization and characterization of the low molecular weight antigen (4-5 kDa) of *Toxoplasma gondii* that elicits an early IgM response upon primary infection. Parasitology 108(Part 2): 139-145

Torpier, G., Charif, H., Darcy, F., Liu, J.L., Darde, M.L., Capron, A. (1993). *Toxoplasma gondii* - differential location of antigens secreted from encysted bradyzoites. Experimental Parasitology, 77(1): 13-22

Town, CD., Dominov, JA., Karpinsky, BA., Jentoft, JE. (1987). Relationships between extracellular pH, intracellular pH, and gene expression in *Dictyostelium discoideum.* Developmental Biology, 122: 354-362

Trinchieri, G. (1993). Interleukine-12 and its role in the generation of Th1 cells. Immunology Today, 14: 335-338

Tytell, M., Barbe, M.F., Brown, I.R. (1993). Stress (heat shock) protein accumulation in the central nervous system. Advances in Neurology, 59: 293-303

Van der Ploeg, L.H.T. (1985). Heat shock genes: regulatory role for differentiation in parasitic protozoa. Science, 228: 1443-1446

Vivier, E., Petitprez, A. (1969). Le complexe membranaire et son évolution lors de l'élaboration des individus-fils de *Toxoplasma gondii.* Journal of Cellular Biology, 43: 329-342

Ware, P.L., Kasper, L.H. (1987). Strain-Specific antigens of *Toxoplasma gondii.* Infection and immunity, 55(3): 778-783

Weiss, L.M., Laplace, D, Tanowitz, H.B., Whittner, M. (1992). Identification of *Toxoplasma gondii* bradyzoïte specific monoclonal antibodies. Journal of Infectious diseases, 166: 4350-4354

Woodison, G., Smith, J.E. (1990). Identidfication of the dominant cysts antigens of *Toxoplasma gondii.* Parasitology, 100: 389-392

Weiss, L.M., Laplace, D., Takvorian, P.M., Cali, A., Tanowitz, H.B., Wittner, M. (1994). Development of bradyzoites of *Toxoplasma gondii* in vitro. Journal of Eukaryotic Microbiology, 41(5): s18

Work, K., and Hutchison, W. M. (1969). Brief report. A new cystic form of toxoplasma gondii. Acta path. microbiol. scandinav. 75, 191-192

Yano, A., Aosai, F., Ohta, M., Hasekura, H., Sugane, K., Hayashi, S. (1989). Antigen presentation by *Toxoplasma gondii*-infected cells to CD4+ proliferative T cells and CD8+ cytotoxic cells. Journal of Parasitology, 75(3): 411-416

Yano, K., Nakabayashi, T. (1986). Attenuation of the virulent RH strain of *Toxoplasma gondii* by passages in mice immunized with *Toxoplasma* lysate antigens. Biken journal 29: 31-47

Yano, K., and Nakabayashi, T. (1984). Delayed secondary immune response in mice immunized with *Toxoplasma* antigens and its effect for protection against *Toxoplasma gondii.* Zentralblatt fuer Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene, Abt. 1, Originale A 256: 381-389

Zilberstein, D., Blumenfeld, N., Liveanu, V., Gepstein, A., Jaffe, CL. (1991). Growth at acidic pH induces an amastigote stage - specific protein in *Leishmania* promastigotes. Molecular and Biochemical Parasitology, 45: 175-178

PLANCHE I

Etude de l'expression des protéines spécifiques de stade (P36, P21 et SAG1) au cours de l'induction de la différenciation vers le stade bradyzoïte en milieu pH 8 (souche pK). Les protéines spécifiques du stade bradyzoïte sont révélées par un conjugué couplé à FITC (fluorescence verte), l'anticorps monoclonal (anti SAG 1) biotinylé est révélé par de la streptavidine couplée à du Texas Red (fluorescence rouge). Les images de fluorescence ont été obtenues par simple exposition avec un filtre double bande (Zeiss). Les individus porteurs de la double spécificité (bradyzoïte et tachyzoïte) présentent une fluorescence orangée.

Les figures a: image en fluorescence

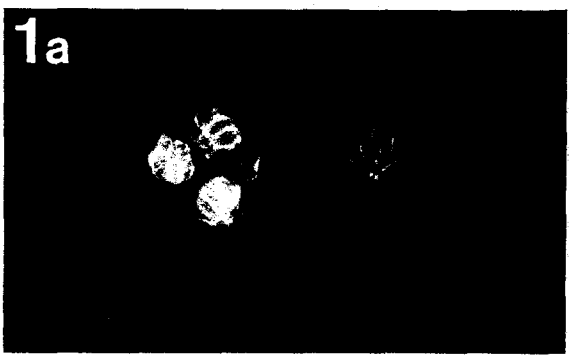
Les figures b: image en contraste de phase

Figure 1:
montre plusieurs vacuoles renfermant des stades intermédiaires après 48 heures de traitement en milieu pH 8. La P36 a été utilisée comme marqueur spécifique du stade bradyzoïte.

Figure 2:
montre des kystes (3) obtenus après 7 jours de culture dans le milieu H8. La P36 a été utilisée comme marqueur spécifique du stade bradyzoïte, on peut noter l'absence de détection de SAG1 à ce stade.

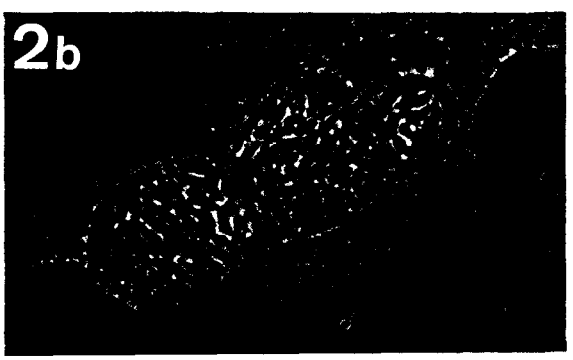
Figure 3:
montre des kystes obtenus après 7 jours de traitement. La P21 a été utilisée comme marqueur spécifique du stade bradyzoïte. Au sein d'un même kyste, certains parasites commencent à exprimer la P21, d'autres pas encore (étoile blanche), aucun des parasites n'exprime SAG1. La flèche blanche indique un petit kyste au sein du quel tous les parasites expriment la P21.

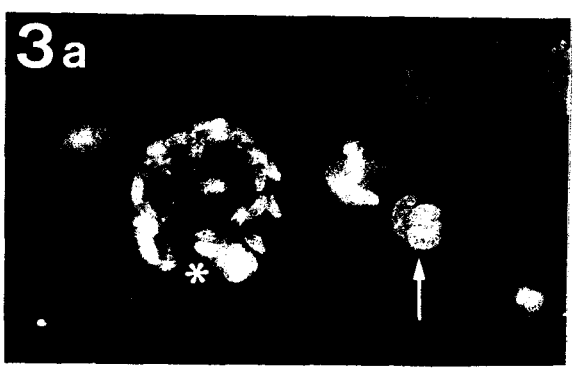
Figure 4:
Noter la persistance des stades intermédiaires (fluorescence orangée) en culture (après 6 jours de traitement en milieu pH8) au sein de compartiments de grandes taille (flèche blanche) correspondant à des structures kystiques immatures. La P36 a été utilisée comme marqueur du stade bradyzoïte. Les têtes de flèche indiquent des kystes plus matures caractérisés par une expression plus intense de la P36 (fluorescence verte).


1a

1b

2a


2b


3a
*

3b
*

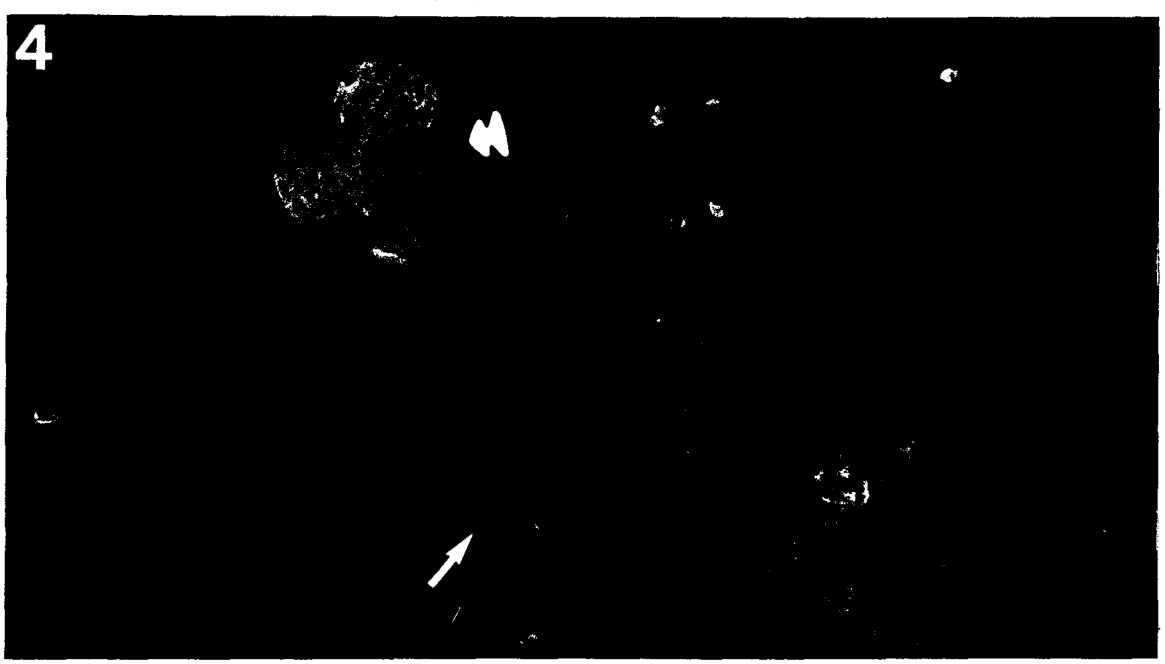

4

PLANCHE II

Expression de la protéine de 116 kDa en conditions normales de culture (prolifération du parasite sous forme tachyzoïte) et au cours de l'induction de la différenciation vers le stade bradyzoïte (milieu pH8). Etude en immunofluorescence par une technique de double marquage: anticorps monoclonal dirigée contre la protéine de 116 kDa révélé par un conjugué couplé à FITC, anti SAG1 biotinylé révélé par la streptavidine – Texas Red.

Les figures a: image en fluorescence (prise en double exposition)

Les figures b: image en contraste de phase

Figure 1:

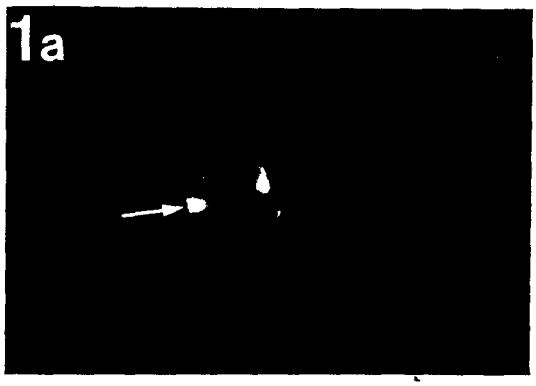
montre une vacuole parasitophore renfermant des parasites SAG1 + en conditions classiques de culture, 48 heures après infestation. On peut observer un léger marquage dans la vacuole (flèche blanche).

Figure 2:

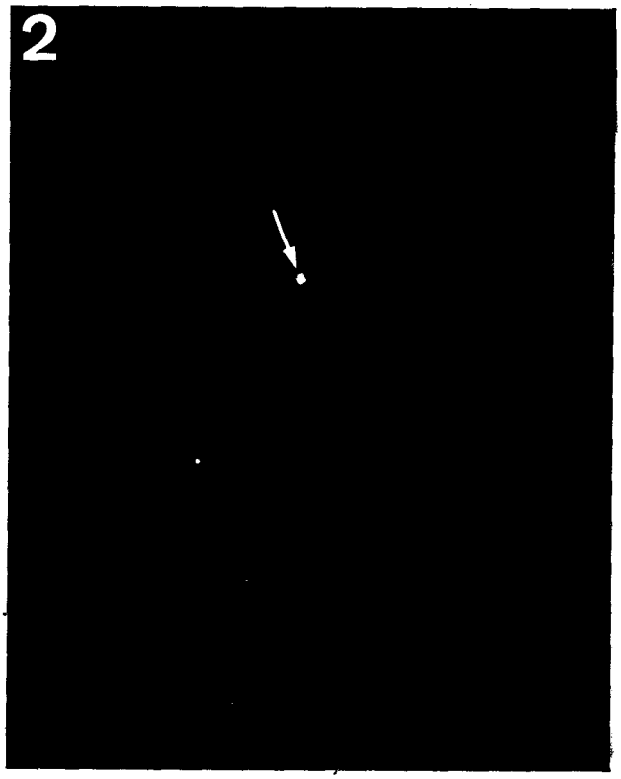
montre une vacuole parasitophore après 4 jours de culture en milieu normal. Noter le léger marquage de la vacuole.

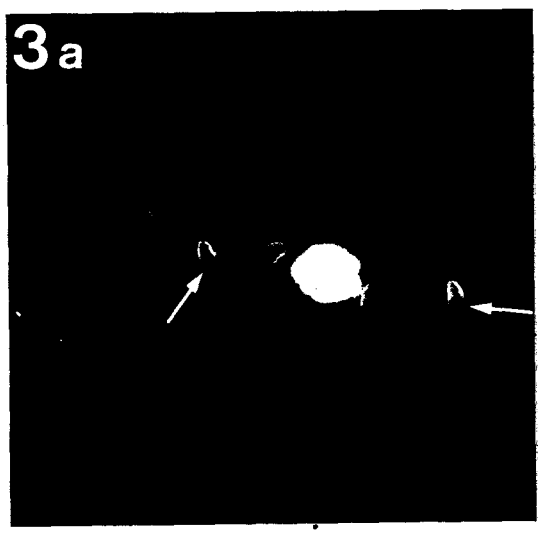
Figures 3 et 4:

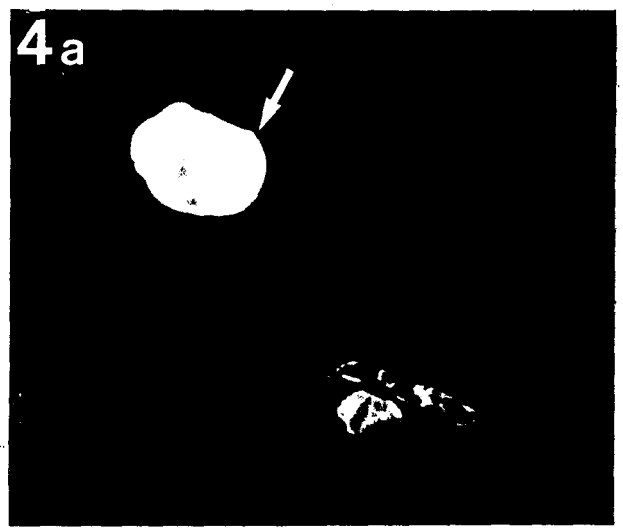
traitement de 48 heures en milieu pH8, montrant un marquage intense des vacuoles en voie de différenciation vers le stade bradyzoïte. Dans la figure 3, on peut observer des parasites extracellulaires (provenant probablement de l'éclatement d'une vacuole): certains présentent un marquage partiel de leur périphérie correspondant vraisemblablement à des parasites entrain de réenvahir une cellule et relarguant en même temps la protéine de 116 kDa qui se serait déposée à la surface du parasite lors de la rupture de la vacuole.

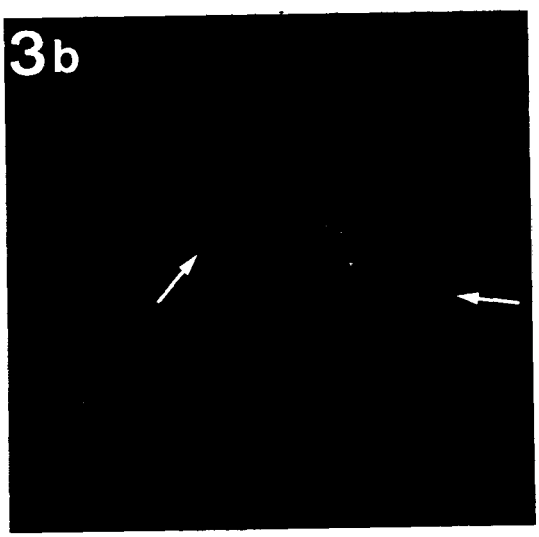

1a

1b


2


3a


4a


3b

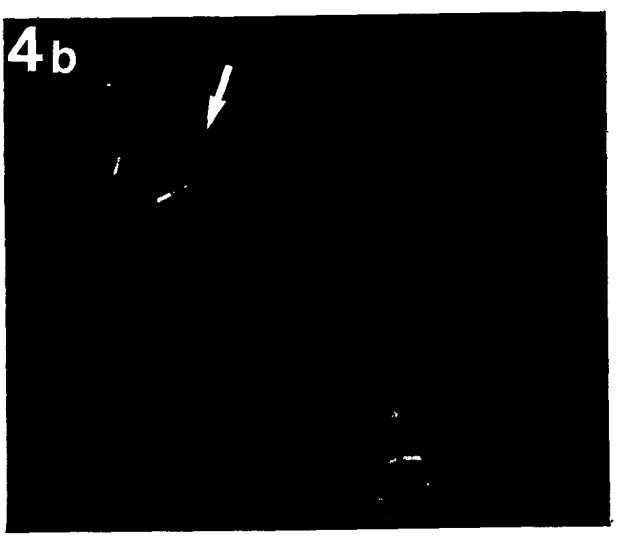

4b

PLANCHE III

Les graphes représentent l'effet: du milieu pH8, d'un donneur de NO (nitroprussiate de sodium), et de deux inhibiteurs de la chaine respiratoire mitochondriale (myxothiazol et rotenone) sur l'induction de l'expression de la protéine P36, spécifique du stade bradyzoïte.

Tous les traitements ont été commencés 6 heures après infection des cellules par les tachyzoïtes (souche pK). Les cellules sont fixées 48 heures après infection. La protéine SAG 1 et la protéine P36 ont été utilisées comme marqueurs spécifiques de stade (tachyzoïte et bradyzoïte respectivement) et détectées par immunofluorescence sur une même préparation.

Chaque barre représente une expérience unique dans laquelle les valeurs sont les moyennes de 3 lamelles, l'écart - type a été calculé. Pour chaque lamelle, 50 champs ont été analysés. Toutes les numérations ont été effectuées au grossissement 40.

Dans chaque cas, le nombre de vacuoles renfermant des parasites exprimant exclusivement SAG 1 et le nombre de vacuoles renfermant des parasites coexprimant SAG 1 et la P36 ont été répertoriés dans le témoin et dans les cultures traitées. Le pourcentage de différenciation (vacuoles renfermant des parasites coexprimant SAG1 et la P36) a été calculé en fonction du nombre total de vacuoles dans l'expérience témoin dans chaque cas, pour tenir compte de l'effet des traitements sur la parasitémie.

Chaque barre représente la population totale (vacuoles) dans chaque expérience, exprimée en pourcentage par rapport à la population totale dans le témoin.
Le secteur hachuré de chaque barre représente la partie de la population qui exprime la P36, le secteur plus clair celle exprimant exclusivement SAG 1.

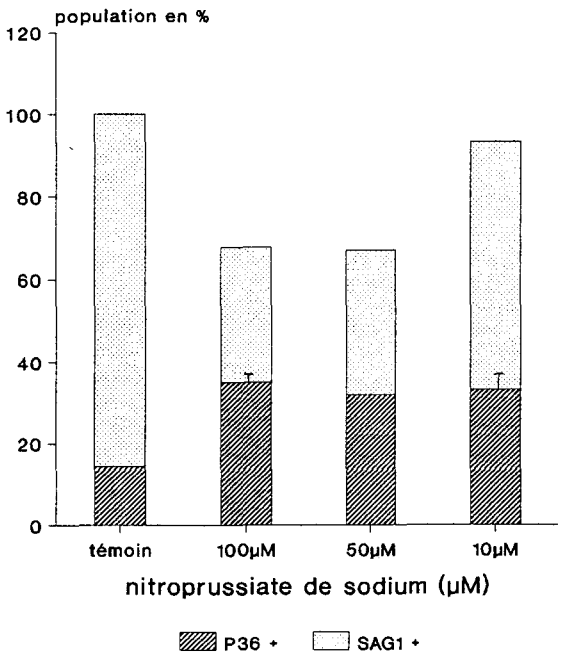
Fig. A:
illustre l'action d'un traitement par le nitroprussiate de sodium sur des cellules véro infectées. Trois concentrations ont été testées: 100μM, 50μM, et 10μM.

Fig. B:
illustre l'action d'un traitement par le Myxothiazol (0,1 μg/ml; 0,05μg/ml; 0,01μg/ml)

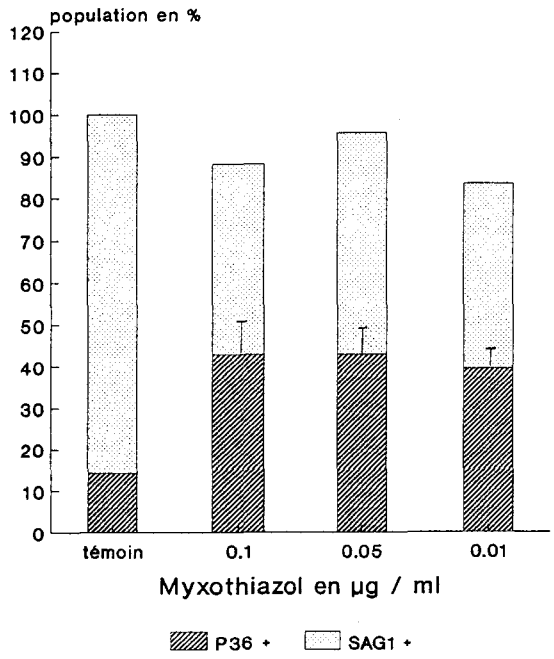
Fig. C:
illustre l'action d'un traitement par la rotenone (0,02mM, 0,01mM, 0,001mM)

Fig. D: illustre l'action du milieu pH 8

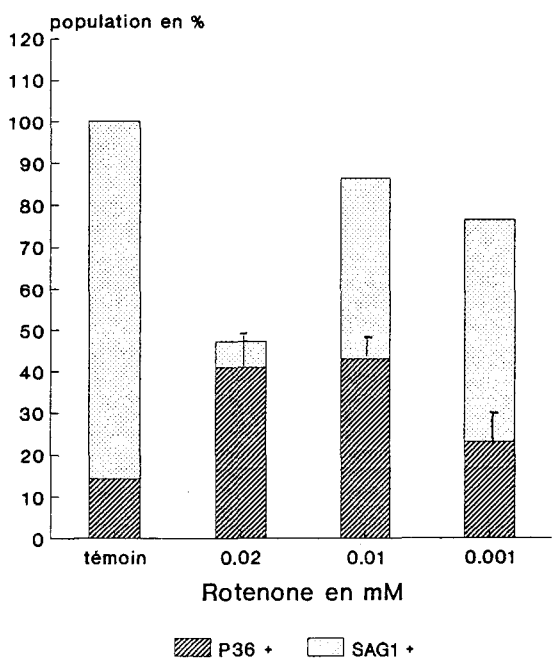
Action du Nitroprussiate



Action du Myxothiazol



Action de la rotenone



Action du milieu pH 8

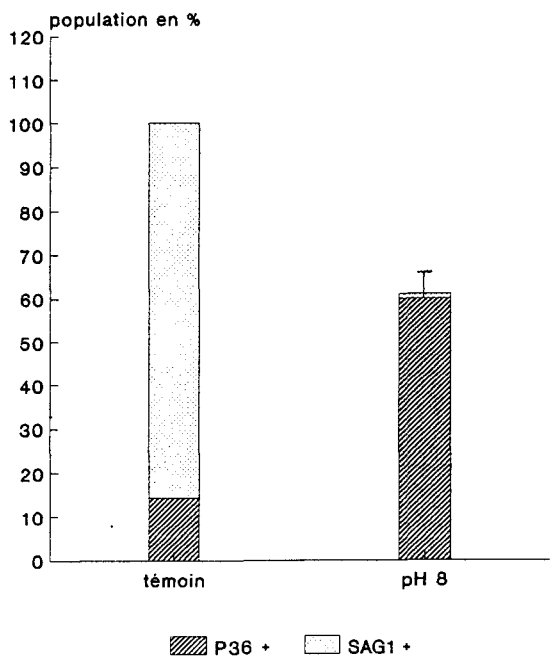


PLANCHE IV

Le graphe représente le taux de multiplication des parasites dans chaque traitement.
Le nombre de parasites par vacuole a été quantifié en distinguant les vacuoles renfermant des parasites exprimant exclusivement SAG 1, et celles renfermant des parasites exprimant également la P36.

Pour chaque lamelle, le nombre moyen de parasites par vacuole a été calculée.

Chaque barre représente la moyenne (du nombre de parasites par vacuole) de 3 lamelles, l'écart type de la moyenne des 3 lamelles a été calculé.

L'expérience témoin, les traitements roténone 0,01mM et 0,001 mM n'ont pas été représentés: le nombre de parasites par vacuole dépassant 32 il s'est avéré impossible de le déterminer dans ces conditions.

Les barres (au motif hachuré) représentent les parasites qui expriment la P36 et SAG 1, les barres plus claires les parasites exprimant exclusivement SAG 1.

Legende:

SNP: Nitroprussiate de sodium, Myx: Myxothiazol, Rot: Rotenone

taux de croissance

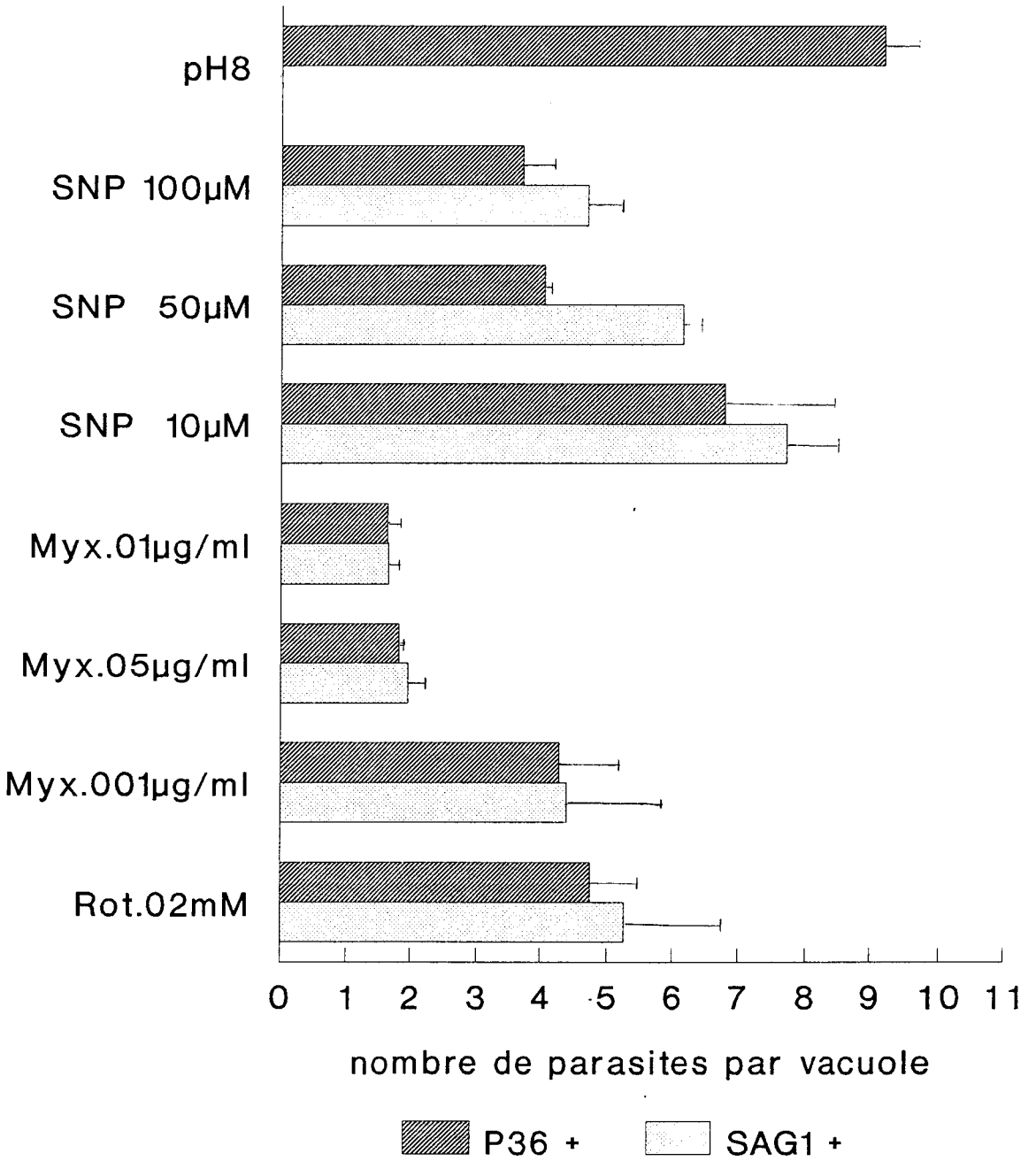


PLANCHE V

Observations en microscopie électronique sur des coupes ultra fines (résine épon) de cellules véro infestées par des tachyzoïtes (souche pK) et placées dans le milieu pH 8. (barre = 1 μm)

Figure A.

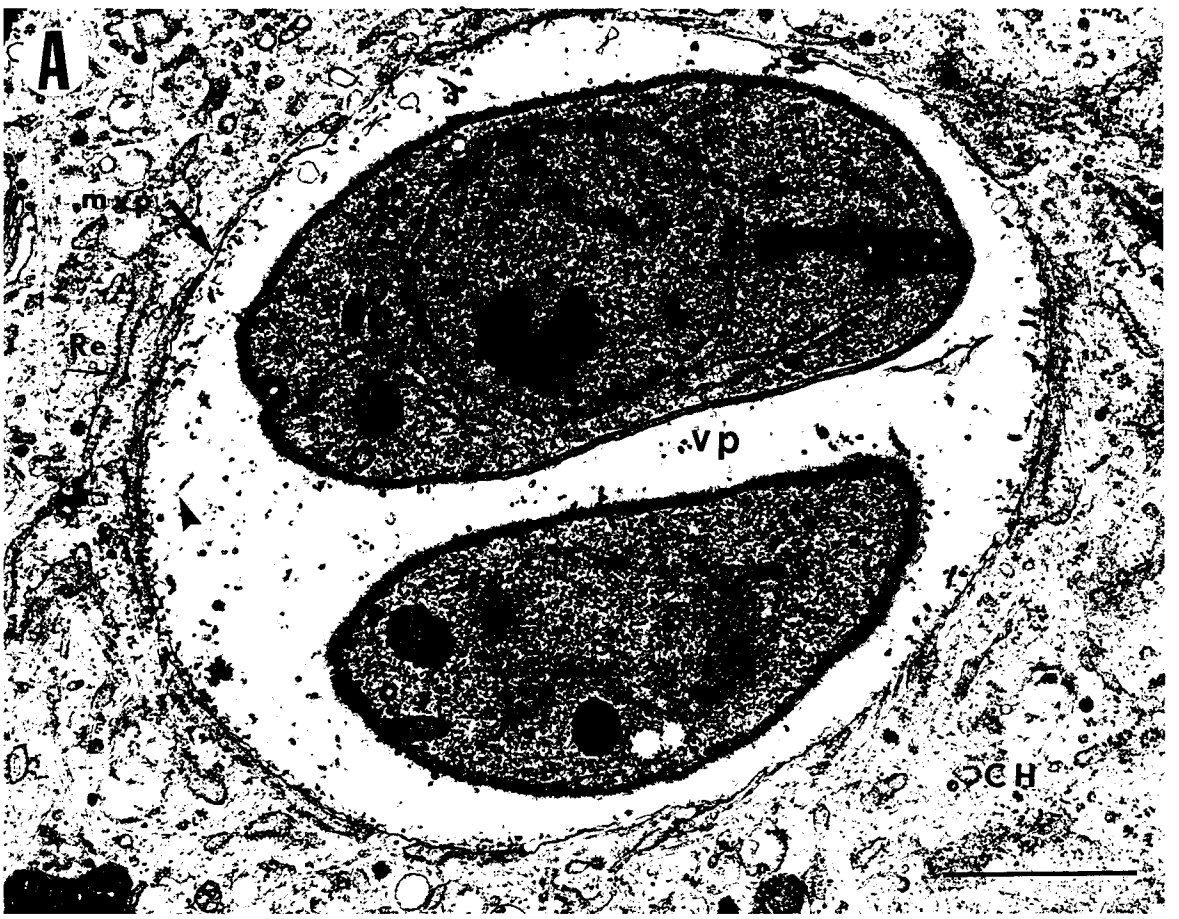
cellules infestées fixées après 24 heures de traitement à pH 8. Noter la modification du réseau intra vacuolaire qui se présente plutôt sous forme vésiculaire que tubulaire. La tête de flèche montre un vestige de ce réseau tubulaire.

Figure B.

cellules infestées fixées après 48 heures de traitement. On remarque l'accumulation d'un matériel granulaire dense (astérisque).

Légende:

n: noyau, vp: vacuole parasitophore, Re: réticulum endoplasmique de la cellule hôte, mpk: membrane de la paroi kystique, mi: mitochondrie du toxoplasme, mp: micropore.


A
mxp
Re
vp
CH

B
mpl
*
mp

PLANCHE VI

Observations en microscopie électronique sur des coupes ultra fines (résine épon) de cellules véro infestées par des tachyzoïtes (souche pK) et cultivées en milieu pH 8. (barre = 1 μm)

Figure A.

Coupe ultra fine montrant des bradyzoïtes au sein d'un kyste obtenu après 7 jours de culture dans le milieu pH 8. Noter la richesse en micronèmes (m) et en grains d'amylopectine (a), témoin d'un stade avancé de différenciation

Figure B.

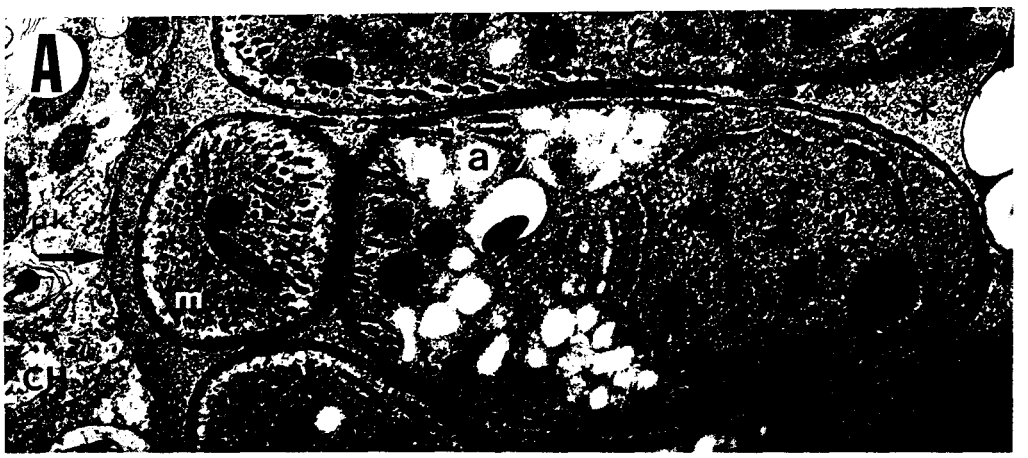
Kyste obtenu après 7 jours de culture dans le milieu pH 8, renfermant des bradyzoïtes immatures (Bi) aux caractéristiques plus proches du tachyzoïte que ceux de la figure précédente. Les parasites sont inclus dans un matériel granulaire dense (astérisque)

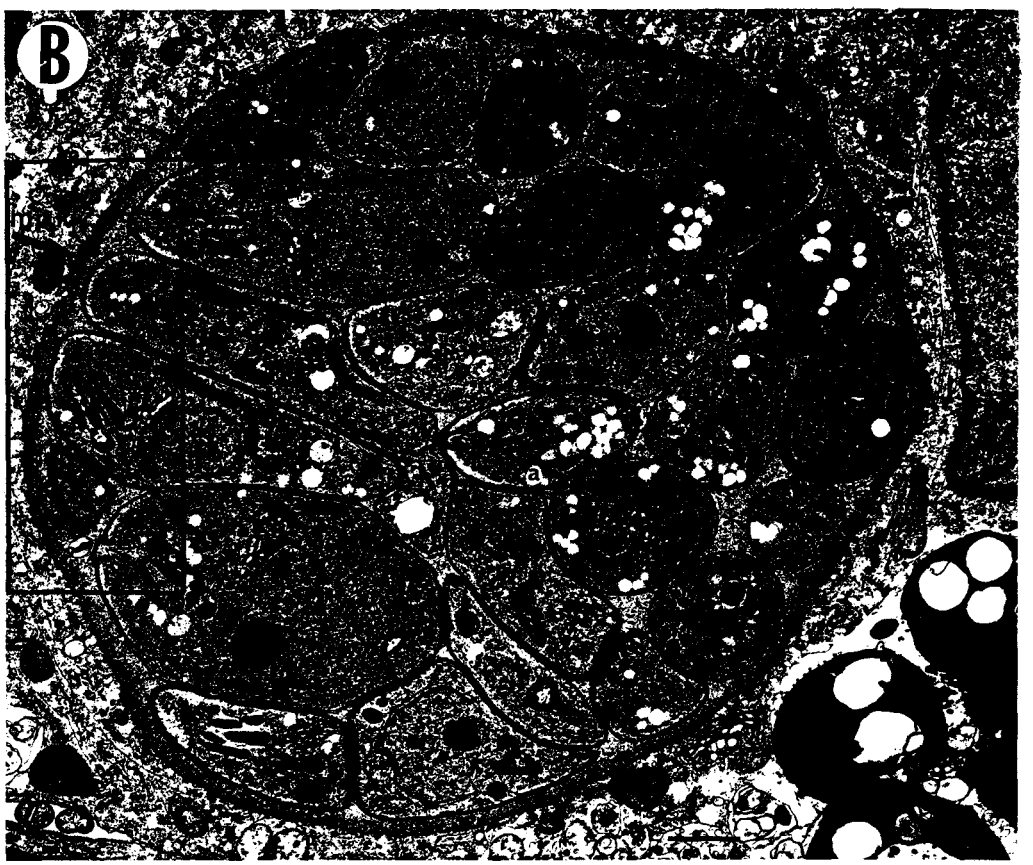
Figure C.

Grossissement de l'encadré de la figure B, montrant le détail de la paroi kystique (pK) dont la membrane présente de nombreuses invaginations.

Légende:

CH: Cellule Hôte, n: noyau du toxoplasme, N: noyau de la cellule hôte, pk: paroi kystique, mpk: membrane de la paroi kystique


A
a
m
mk
cl


B
a

C
CH
mk

PLANCHE VII

Immunolocalisation ultrastructurale de la protéine de 116 kDa à l'aide de l'anticorps monoclonal 73.1.8 sur des cryosections de culture infectées par pK et cultivées en milieu pH 8.

Figure A.

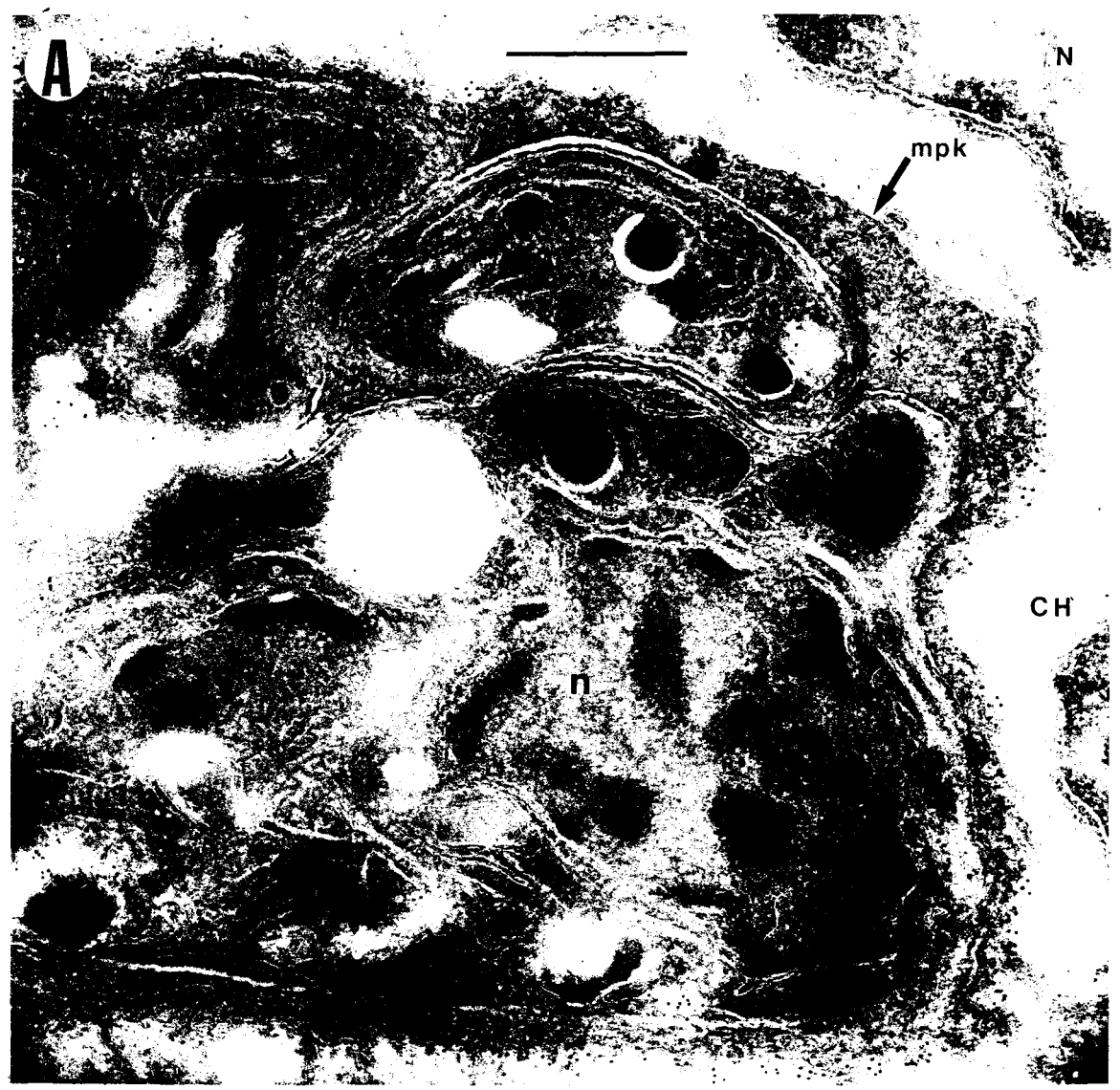
Immunodétection sur des cellules infestées fixées après 48 heures de culture dans le milieu pH 8. Le marquage de la protéine de 116 kDa est localisé dans la paroi kystique, noter l'absence de marquage dans le matériel granulaire (astérisque) entre les parasites.(barre = 0,5 μm)

Figure B.

Immunodétection sur des cellules fixées après 7 jours de culture dans le milieu pH 8. Noter le marquage de la paroi kystique, de la membrane des parasite (indiqué par la grosse flèche), et le marquage de l'amylopectine (a) probablement non spécifique. (barre = 1 μm)

Légende:

N: noyau de la cellule hôte, CH: cellule hôte, n: noyau du toxoplasme, g: granule dense, mi: mitochondrie, pk: paroi kystique, mpk: membrane de la paroi kystique, m: micronème, a: grains d'amylopectine


A
N
mpk
*
CH
n

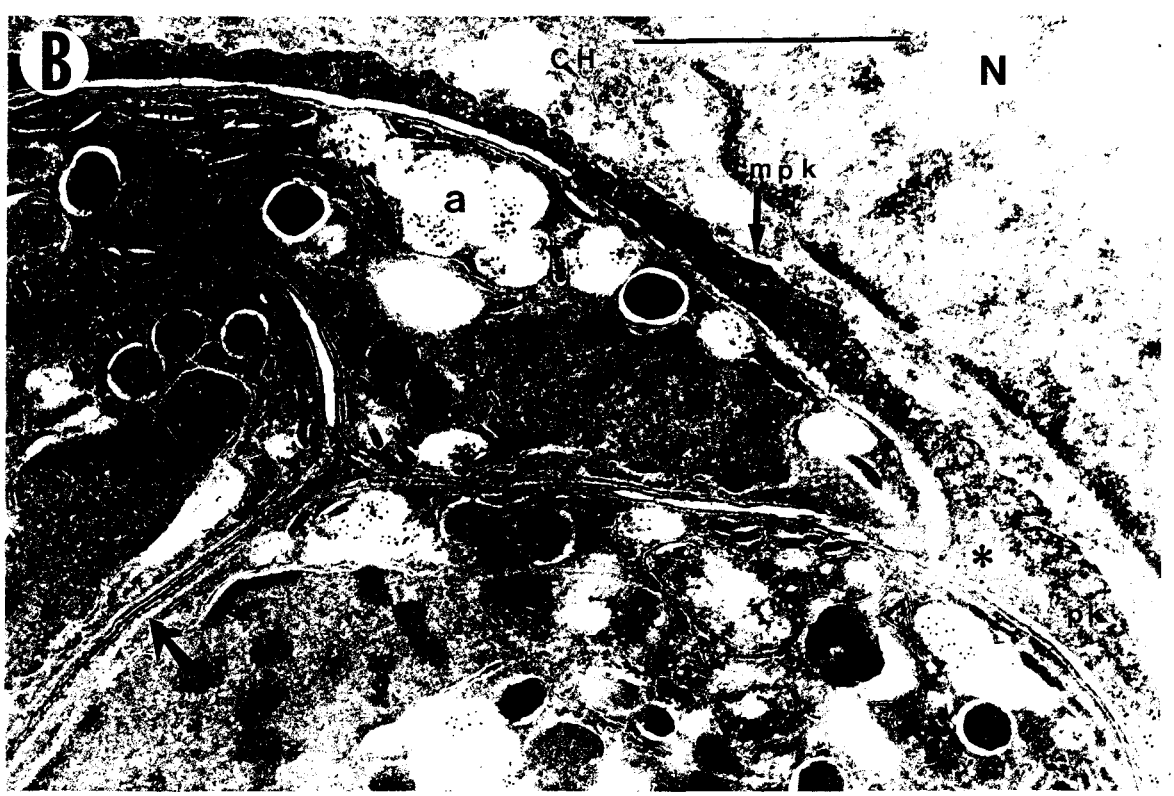

B
CH
N
mpk
a
*
pk

PLANCHE VIII

Immunodétection ultrastructurale sur des cryosections de cultures infectées et cultivées dans le milieu pH 8. (barre = 0,5 μm)

Figure A.

Immunodétection de la protéine GRA 3 sur des kystes obtenus après 9 jours de culture dans le milieu pH 8, souche RH. Noter le marquage de la membrane de la paroi kystique (mpk) ainsi que dans la paroi kystique (pk)

Figure B.

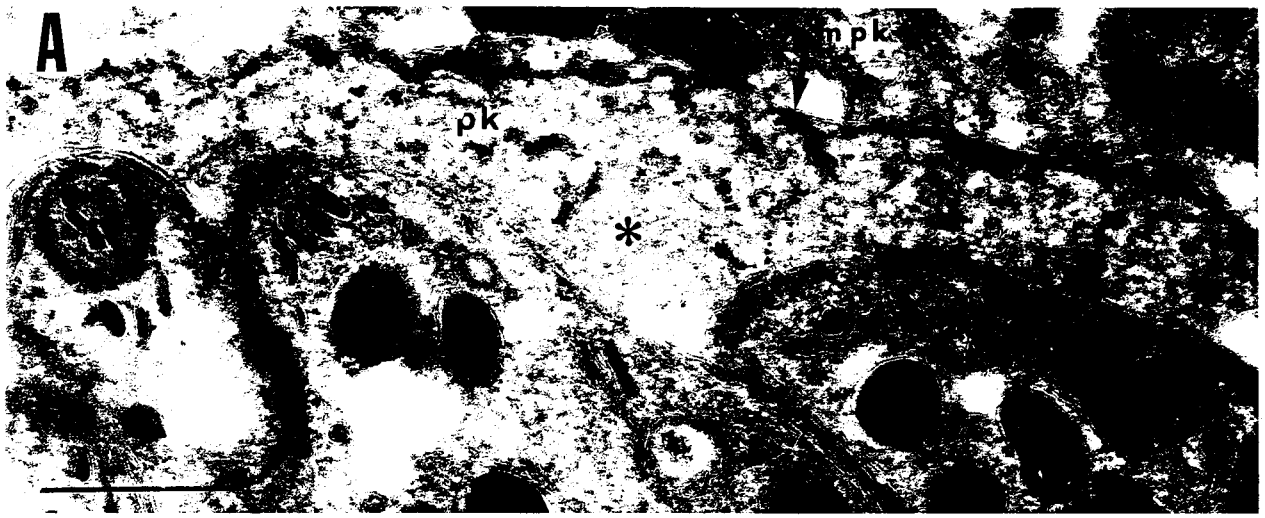
Immunolocalisation de la protéine GRA 2. Le kyste est obtenu *in vitro* après 7 jours de culture dans le milieu pH 8 (souche pK). Marquage localisé dans la paroi kystique, noter le marquage des granules denses (g).

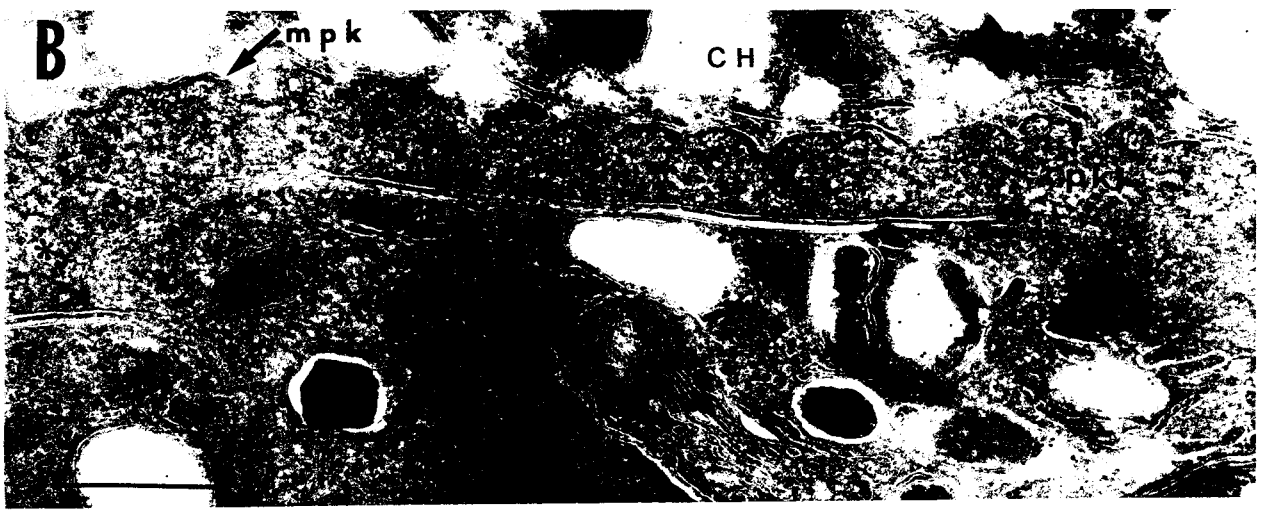
Figure C.

Immunolocalisation de la protéine de 21 kDa sur des coupes de kystes obtenus *in vitro* après 7 jours de traitement dans le milieu pH 8, souche pK. Le marquage est essentiellement localisé au niveau des micronèmes (m).

Légende:

CH: cellule hôte, *: matériel granulaire dense.


A
mpk
pk
*


B
mpk
CH
pk

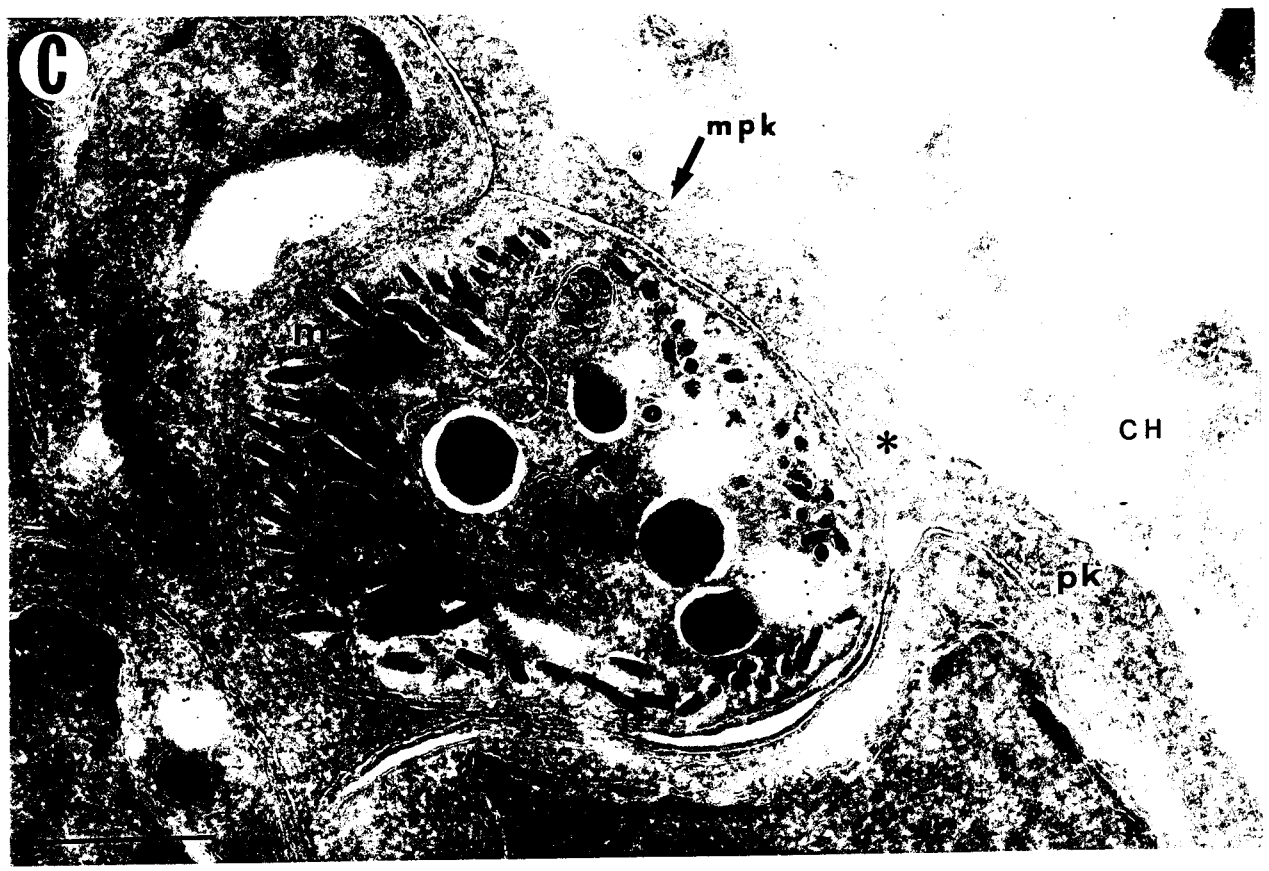

C
mpk
m
*
CH
pk

PLANCHE IX

Immunolocalisation de la protéine P18 sur des coupes de cellules véro infectées et cultivées en milieu pH 8 (cryoultramicrotomie). (barre = 1 μm)

Figure A.

Immunodétection ultrastructurale de la protéine de 18 kDa à l'aide de l'anticorps monoclonal T8 3B1 sur des cellules infestées par des tachyzoïtes de la souche pK, cultivées en milieu pH 8 et fixées après 48 heures de traitement. Le marquage (grains d'or) est exclusivement localisé à la périphérie du parasite (flèche)

Figure B.

Immunodétection de la protéine P18 sur des cellules infectées par pK, cultivées en milieu pH 8 et fixées après 7 jours de traitement. Structure kystique renfermant des parasites présentant un marquage membranaire (flèche) et qui sont inclus dans un matériel dense (astérisque). Le marquage dans la paroi kystique est rencontré occasionnellement, il est encore non expliqué. Noter le marqage plus intense des parasites extracellulaires (problème d'accessibilité des anticorps) ainsi que le marquage de structures non identifiées dans les parasites.

Figure C.

Marquage de la surface d'un parasite (souche RH), sur une coupe de cellule infectée et cultivée en milieu pH 8 pendant 9 jours.

Légende:

n: noyau du toxoplasme, CH: cellule hôte, m: micronème, pk: paroi kystique, mpk: membrane de la paroi kystique.

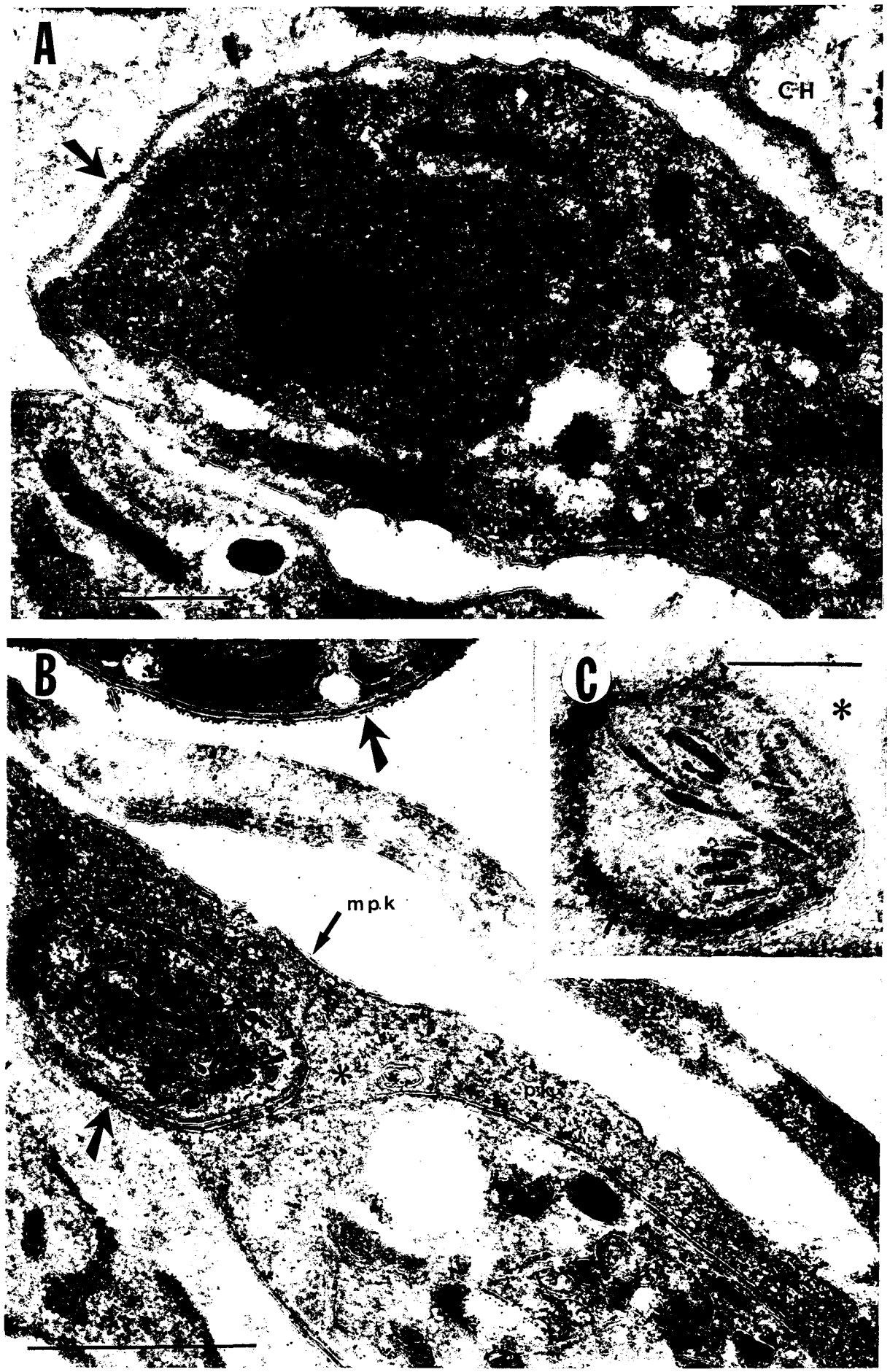

A
CH
B
mpk
psk
C

PLANCHE X

Figure A.

Etude en Western blot après biotinylation de parasites (souche pK) purifiés provenant d'une culture placée en milieu pH 8 pendant 3 jours. Les parasites ont été biotinylés, puis solubilisés et les protéines étudiées ont été immunoprécipitées par les anticorps monoclonaux correspondants.

pistes a: révélation par la streptavidine - peroxydase et le DAB.

pistes b: révélations par les anticorps monoclonaux correspondants

1: IADS anti Rop 234
2: IADS anti SAG1
3: IADS anti P18
4: IADS anti P36

Figure B.

Autoradiographie: Immunoprécipitation par l'immunoadsorbant (IADS) anti P18 après marquage métabolique à l'isoleucine tritiée de parasites intracellulaires pendant 12 heures.

piste 1: parasites cultivés pendant 3 jours dans le milieu pH8. Noter le marquage d'une bande à 18 kDa, et celui mineur vers 21 kDa

piste 2: parasites cultivés en milieu normal. Absence de bande marquée à 18 kDa

Les bandes observées vers 50 000 Da sont des contaminants non identifiés.

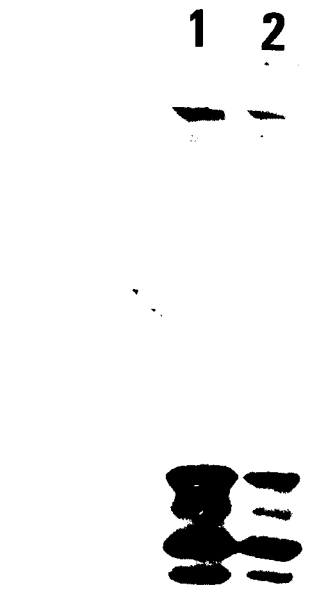
Figure C.

Autoradiographie. Marquage à la glucosamine tritiée d'une culture infectée et placée dans le milieu pH 8 pendant 3 jours. Immunoprécitation du lysat par différents IADS:

piste 1: IADS anti GRA2
piste 2: IADS anti P18
piste 3: IADS anti SAG1

Figure A

Figure B



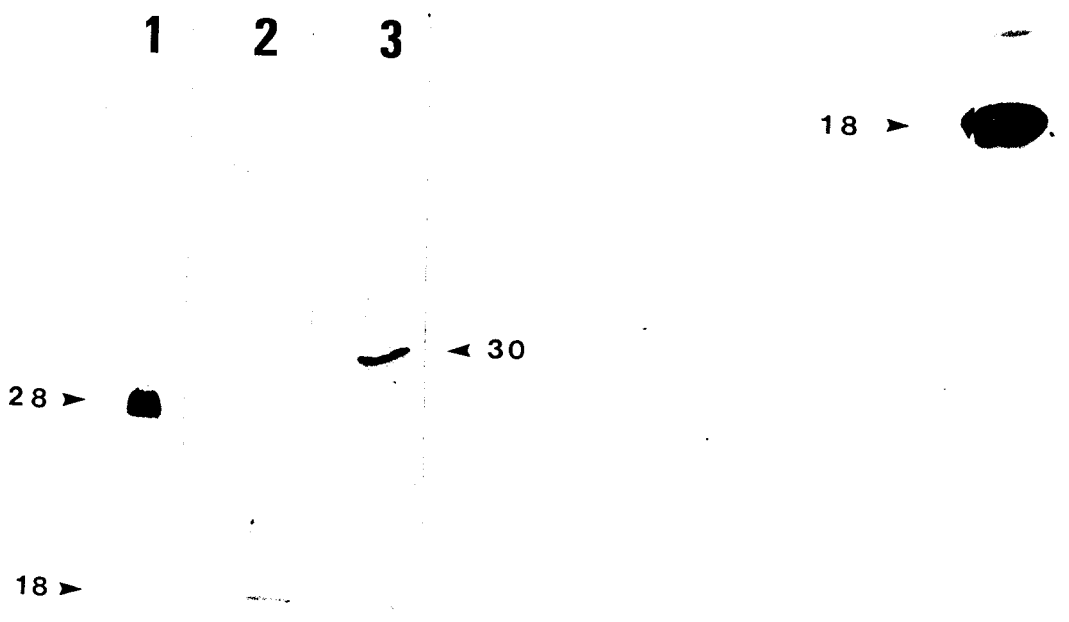


Figure C

PLANCHE XI

Analyse en gel d'agarose 2% des fragments amplifiés par PCR correspondant à une partie du gène de la P18.

piste 1:

amplification d'un fragment de 200 pb à partir du DNA génomique de la souche pK. Les primers utilisés sont: le primer 5' (n°1) et le primer 3' (n°1).

piste 2:

amplification d'un fragment d'environ 60 pb. Les primers utilisés sont: primer 5' interne (n°2) et le primer 3' interne (n°2).

piste 3:

amplification d'un fragment d'environ 120 pb avec le primer 5' interne (n°2) et le primer 3' (n°1).

piste 4:

amplification d'un fragment d'environ 130 pb avec le primer 5' (n°1) et le primer 3' interne (n°2)

piste 5:

amplification d'un fragment d'environ 200 pb à partir du DNA génomique de la souche RH.

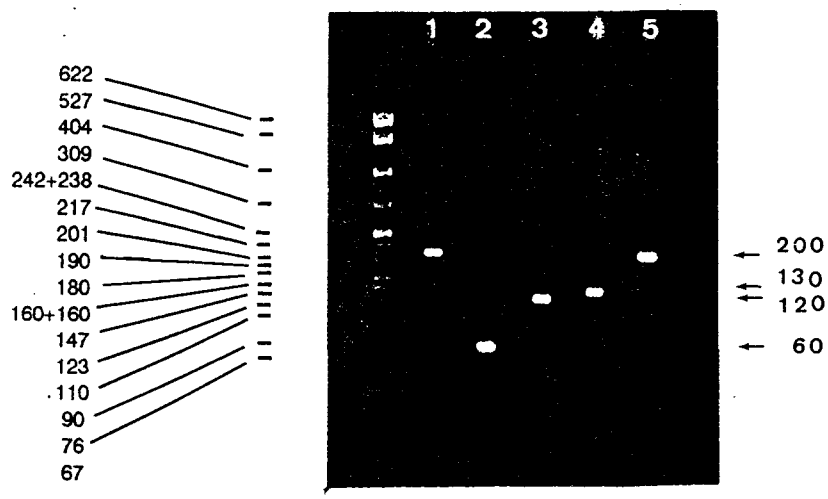
Tous les primers utilisés sont dégénérés et déduits de la séquence en acides aminés déterminée.

primer 5' (n°1): oligonucléotide déduit de la séquence en acides aminés (a).
primer 5' interne (n°2): oligonucléotide déduit de la séquence (b).
primer 3' (n°1): oligonucléotide déduit de la séquence (c).
primer 3' interne (n°2): oligonucléotide déduit de la séquence (d).

5'

S W T Y D F K K A L D D D E T K K E I I T P G D S V S I E N S G S
a b

R P L E Y I P P .....D E P V E H A A .....
d c 3'



Séquence nucléotidique du fragment amplifié (de 200 pb) et sa traduction en acides aminés

```
                    |                 a                |
GGGGGATCCGCCCCCCGAATTCCTGGACTTACGATTTCAAGAAGGCGCTGGACGACGATG
   G  I  R  P  P  N  S  W  T  Y  D  F  K  K  A  L  D  D  D

                 |          b          |
AAACAAAGAAGGAGATTATCACACCGGGCGATAGTGTTTCGATAGAGAATTCAGGGAGCC
E  T  K  K  E  I  I  T  P  G  D  S  V  S  I  E  N  S  G  S

  |          d          |
GCCCTCTTGAGTACATCCCGCCCAACCCTAGTCAAGTTCTCAAGGTTGAAAAGGGAGACC
R  P  L  E  Y  I  P  P  N  P  S  Q  V  L  K  V  E  K  G  D

           |          c          |
ACTGCAAGGACGAACCTGTCGAACACGCCGCGGGCTAGAGCGGC
H  C  K  D  E  P  V  E  H  A  A  G  -  S  G
```

Les parties soulignées correspondent aus résidus d'acides aminés connus.
Les parties en gras correspondent aux séquences nucléotidiques utilisées comme amorce en PCR pour amplifier le fragment.

ANNEXE

(articles)

EXPERIMENTAL PARASITOLOGY 76, 259–264 (1993)

Toxoplasma gondii: Kinetics of Bradyzoite–Tachyzoite Interconversion *in Vitro*

M. SOETE, B. FORTIER, D. CAMUS, AND J. F. DUBREMETZ

INSERM Unité 42, 369 rue Jules Guesde 59 650, Villeneuve d' Ascq, France

SOETE, M., FORTIER, B., CAMUS, D., AND DUBREMETZ, J. F. 1993. *Toxoplasma gondii:* Kinetics of bradyzoite–tachyzoite interconversion *in vitro*. *Experimental Parasitology* 76, 259–264. Stage-specific monoclonal antibodies have been used to investigate the bradyzoite–tachyzoite interconversion of *Toxoplasma gondii in vitro*. The differentiation of bradyzoites isolated from brain cysts (strains 76K and BQNC2) and grown in culture proceeded through intermediate stages which expressed both the specific markers of bradyzoites (P36, P34, P21, and P18) and a specific marker of tachyzoites (SAG1—P30). Differentiation started before parasite division, but large vacuoles containing intermediate stages were also found, suggesting that these were able to multiply. Intermediate stages were also observed during the differentiation of peritoneal tachyzoites (strain Prugniaud) into bradyzoites *in vitro*. Triggering of bradyzoite protein synthesis is not a single event since one of the four bradyzoite-specific proteins (P21) always appeared later than the others during bradyzoite differentiation. During interconversion, heterogenous vacuoles containing parasites expressing different levels of bradyzoite or tachyzoite proteins were observed. This observation together with the fact that differentiation is not synchronous within a culture or within a host cell suggest a complex triggering process. © 1993 Academic Press, Inc.

INDEX DESCRIPTORS AND ABBREVIATIONS: *Toxoplasma gondii,* Protozoa; Coccidia; Tachyzoite; Bradyzoite; Differentiation: *In vitro;* Phosphate-buffered saline (PBS); Immunofluorescence assay (IFA); Fetal calf serum (FCS); Monoclonal antibody (MAb); Post infection (pi).

INTRODUCTION

When *Toxoplasma gondii* infects an intermediate host, it develops into an acute phase (tachyzoites) usually followed by a chronic phase (bradyzoites). In immunocompetent intermediate hosts, the multiplication of tachyzoites is considered to be normally inhibited by immune mechanisms that bring about the encystment of parasites at the bradyzoite stage (Frenkel 1973). When the immune defence is reduced, bradyzoites are able to reinitiate the multiplication of tachyzoites (toxoplasmic reactivation) that produce brain abscesses which are eventually fatal (Frenkel *et al.* 1975). Understanding the mechanism of the bradyzoite–tachyzoite interconversion would therefore allow a better control of toxoplasmic reactivation. Studies *in vitro* (Darde *et al.* 1989) have shown that immunologic factors are not necessary for cyst formation. One can therefore develop an *in vitro* model to study the interconversion and analyze the phenomenon without facing the complexity of the host response. Studying interconversion requires specific markers of parasite differentiation. Morphologic differences between tachyzoites and bradyzoites and building of a cyst wall were the only criterions of differentiation available so far. They required the use of electron microscopy. MAbs specific for bradyzoite proteins have been recently developed in our laboratory (Tomavo *et al.* 1991), which allowed us to study the interconversion *in vitro*. As a preliminary step toward functional analysis, we have analyzed the kinetics of the spontaneous conversion that occurs when seeding cells with bradyzoites released from brain cysts or with tachyzoites released from the perito-

0014-4894/93 $5.00
Copyright © 1993 by Academic Press, Inc.
All rights of reproduction in any form reserved.

neal cavity of infected mice. In this paper we describe the time course and patterns of stage-specific antigen expression during the transformation of bradyzoites into tachyzoites, and of tachyzoites into bradyzoites *in vitro*, in the absence of immune effectors.

Material and Methods

Host cells and parasites. Human fibroblasts MRC5 (Biomerieux) were grown in Dulbecco's minimal essential medium supplemented with antibiotics and 10% FCS. The serum concentration was reduced to 5% for infection. The cultures were maintained at 37°C in 5% CO_2. Vero cells (African Green Monkey fibroblasts) were also used in some experiments and grown in the same medium with 5% FCS.

We have used three strains of *T. gondii* that induce chronic infections in Swiss mice: strains 76K, BQNC2, and Prugniaud. They were passaged every 2 months by oral infection with 20 cysts collected from the brain of an infected animal. Strain BQNC2 was recently isolated from a human infection, used to infect mice, multiplied *in vitro*, and cloned by limited dilution (B. Fortier, unpublished). Strain 76K had been isolated from a guinea pig (Laugier and Quilici 1970) and is routinely used as chronic strain in the laboratory. Strain Prugniaud had been isolated from a case of human lethal congenital toxoplasmosis (Martrou *et al.* 1965) and was passaged every 4 days by intraperitoneal inoculation of parasites.

Monoclonal antibodies. The production and specificity of the MAbs have been described previously (Couvreur *et al.* 1988; Tomavo *et al.* 1991). We have used four MAbs specific for bradyzoite membrane proteins: P36 (T8 4A12), P34 (T8 2C2), P21 (T8 4G10), and P18 (T8 3B1) which are not found on the tachyzoite, and one MAb specific for the major surface protein of tachyzoite: SAG1 (P30; T4 1E5) which is not expressed by bradyzoites. The SAG1-specific immunoglobulins were purified and biotinylated with Act-biotin (IBF).

Parasite culture. Cell cultures were infected with 76K or BQNC2 bradyzoites obtained from mouse brain cysts harvested in sterile condition in PBS. Cysts were purified through Percoll (Cornelissen *et al.* 1981), and bradyzoites were released from purified cysts by a 5-min incubation in 0.5% pepsin in 0.1 *N* HCl solution. Bradyzoites, (10^4) were added in each well of Lab-Tek Tissue culture chamber on glass slides where 5.10^5 fibroblasts had been plated 72 hr earlier.

Cell cultures were also infected with tachyzoites of the Prugniaud strain harvested from the peritoneal cavity of infected mice, using the same plating conditions.

IFA. The slides were fixed in 2% formaldehyde in PBS for 30 min at 15, 24, 48, and 72 hr after infection. Cells were permeabilized in acetone at −20°C. A double IFA was used to detect bradyzoite and tachyzoite-specific proteins on the same slide. The fixed infected cells were incubated with a bradyzoite-specific MAb (T8 4A12 or T8 2C2, or T8 4G10 or T8 3B1) diluted 1/100, washed in PBS, and incubated with fluorescein-conjugated goat anti-mouse IgG diluted 1/200. In a second step, the cells were incubated with biotinylated anti-SAG1 diluted 1/100, washed, and incubated with sulforhodamine streptavidin (Boehringer-Mannheim) diluted 1/200. Observations were performed on a Leitz Ortholux microscope equipped for epifluorescence and recorded on Ektachrome 400 film.

Results

Differentiation of bradyzoites (BQNC2 and 76K strains) into tachyzoites. The development of bradyzoites obtained from mouse brain cysts was studied in MRC5 cell cultures. A semiquantitative analysis of the kinetics of transformation of bradyzoites into tachyzoites is given in Table I. The double IFA labeling, using bradyzoite-specific probes and a tachyzoite-specific probe on the same preparation, allowed us to distinguish between three stages: parasites expressing exclusively bradyzoite-specific markers (B^+P30^-); parasites coexpressing bradyzoite- and tachyzoite-specific markers (B^+P30^+); and parasites expressing only the tachyzoite-specific marker (B^-P30^+). At the beginning of the experiment, 100% of parasites were positive for all four bradyzoite-specific proteins and did not react with the SAG1-specific MAb. At 15 hr pi, we observed intermediate stages which were doubly labeled. This stage expressed SAG1 but also reacted with bradyzoite-specific MAbs (Fig. 1). At about 24 hr pi parasite division began: we could observe vacuoles containing two organisms expressing both bradyzoite- and tachyzoite-specific markers. At 48 hr pi, we observed more multiplication of doubly labeled parasites (Fig. 2): some were more intensively labeled with bradyzoite-specific markers and others reacted more for SAG1, and we could find organisms having completely lost bradyzoite-specific reactivity and which were therefore considered as

TABLE I
Kinetics of Differentiation of Bradyzoites into Tachyzoites

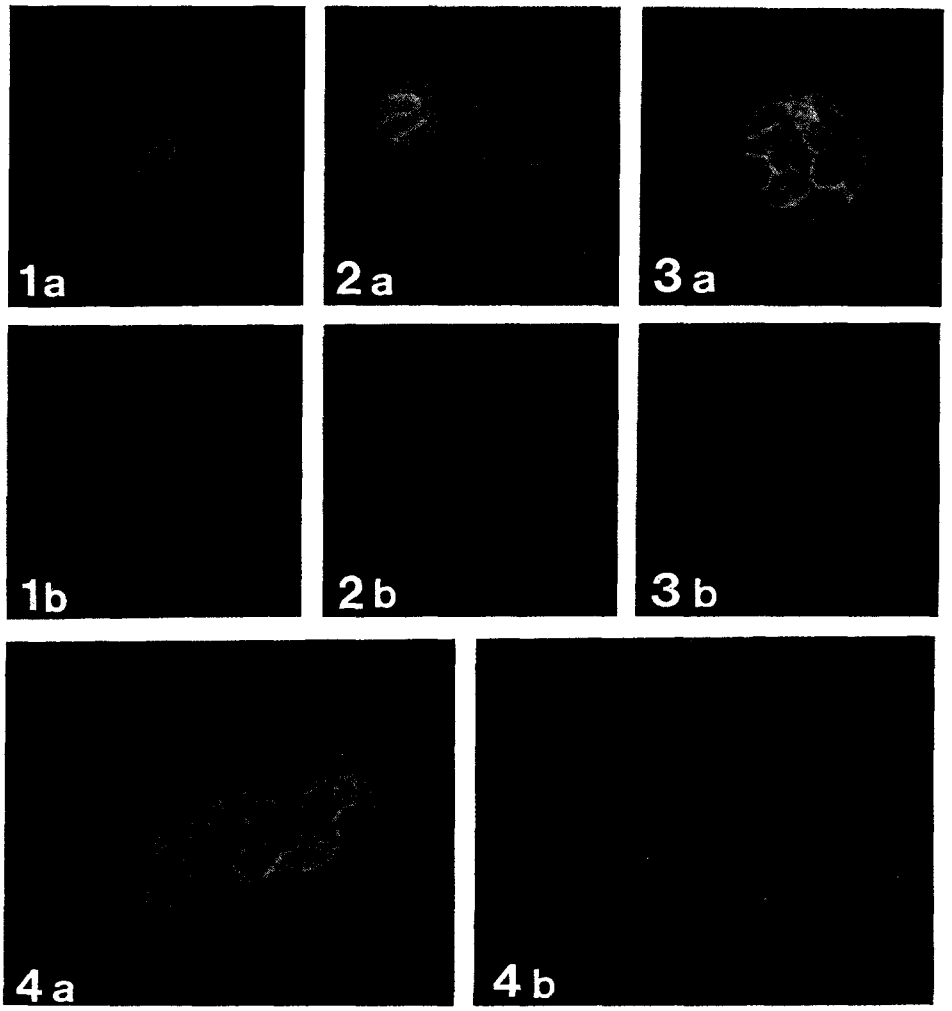
		BQNC2 strain (%)				76K strain (%)			
Time (hr)	Form	P36/P30	P34/P30	P21/P30	P18/P30	P36/P30	P34/P30	P21/P30	P18/P30
0	B^+P30^-		100				100		
24	B^+P30^-	29	31	40	48	74	68	72	68
	B^+P30^-	71	69	60	52	26	32	28	32
58	B^+P30^-		+				+		
	Vacuole B^+P30^-		+				−		
	Vacuole B^+P30^+		+ + +				+ + +		
	Vacuole B^-P30^+		+				+		
72	B^+P30^-		+				+		
	Vacuole B^+P30^-	+	+						
	Foci B^+P30^+		+ + +				+ +		
	Foci B^-P30^+		+ +				+ + +		
	Heterogenous vacuole		+				−		

Note. These data are from a representative experiment. Bradyzoites (BQNC2 and 76K strains) purified from brain cysts were allowed to invade MRC5 cells. Infected cells were fixed at various time points after infection and processed for a double IFA using each of the bradyzoite-specific MAbs associated with biotinylated SAG1-specific MAb. Three different patterns of labeling were found: B^+P30^-, parasites expressing only the bradyzoite-specific markers; B^+P30^+, parasite expressing both SAG1 and bradyzoite-specific markers; B^-P30^+, parasite expressing only SAG1. At early time points, a quantitative analysis of stages was performed (about 500 parasites were observed and the different forms were reported as a percentage of total number of parasites). At later stages, when parasites release and invasion of adjacent cells had occurred, individual numbering was no longer possible and the relative abundance of the different forms was figured by +, + +, or + + +. (Vacuole, multiplication of parasites within a parasitophorous vacuole; heterogenous vacuole, coexistence of parasites expressing different surface markers within a parasitophorous vacuole.)

tachyzoites. The relative amount of doubly labeled parasites decreased during the course of the experiment, due to disapearance of bradyzoite-specific proteins expression and to multiplication of tachyzoites which diluted the other stages. From 48 hr pi onward, a quantitative analysis was no longer possible since reinvasion had occurred: parasites liberated from a vacuole after several cycles of multiplication caused the lysis of the host cell and reinvaded other cells generating foci of multiplication. At around 48 hr pi for BQNC2 strain and at round 72 hr pi for 76K strain, we observed small vacuoles containing several organisms which did not react for SAG1-specific MAb, showing the ability of bradyzoites to multiply and generate daughter cells expressing exclusively bradyzoite-specific markers.

Infection by BQNC2 bradyzoites generated heterogenous parasitophorous vacuoles at 72 hr pi. Indeed, within an single parasitophorous vacuole, we found parasites expressing different levels of bradyzoite or tachyzoite molecules: what was found usually were vacuoles with intermediate organisms mixed together with SAG1-negative or -positive parasites (Figs. 3 and 4). We did not observe such vacuoles with strain 76K.

Differentiation of tachyzoites (Prugniaud strain) into bradyzoites. The evolution of tachyzoites harvested from mouse peritoneal cavity was followed in Vero cells culture, using stage-specific markers and IFA. The parasites collected from mouse peritoneal cavity did not react with bradyzoite-specific MAbs, but expressed SAG1. At 24 hr pi, we observed essentially tachyzoites which were dividing and a low percentage of parasites reacting faintly with three of the four bradyzoite-specific MAbs (P36, P34, and P18). At 48 hr pi, we observed typical doubly labeled parasites which were dividing, although the tachyzoite were still a large majority. But no parasites reacted for P21-specific MAb. At 72 hr pi, organisms having completely lost the tachyzoite-specific determinant began to appear, yet no reactivity to anti P21 was observed. Heterogenous vacuoles similar to those ob-



FIGS. 1–4. Double IFA of *Toxoplasma gondii* grown *in vitro* using BQNC2 strain bradyzoites as the inoculum on MRC5 fibroblasts. Each bradyzoite-specific MAb (Figs. 1a, 2a, 3a, and 4a) was tested in parallel with the SAG1-specific MAb (Figs. 1b, 2b, 3b, and 4b). Figure 1 shows an intermediate stage (B+P30+) at 24 hr pi. Figure 2 shows two vacuoles at 48 hr pi, one of which expresses more of the bradyzoite-specific marker and the other more of the SAG1. Figure 3 shows an heterogenous parasitophorous vacuole at 72 hr pi: most of the parasites express bradyzoite-specific proteins and one expresses SAG1. Figure 4 shows an heterogenous vacuole at 72 hr pi, in which a wide range of differential expression is found, from B+P30− to B−P30+. (Figs. 1a and 3a, P18-specific MAb; Fig. 2a, P34-specific MAb; Fig. 4a, P21-specific MAb).

served during BQNC2 transformation were also found. This partial *in vitro* differentiation of tachyzoites into bradyzoites occurred "spontaneously" in Vero cells, since these were grown in their usual medium and culture conditions.

DISCUSSION

A modification of the antigenic specificity of bradyzoites developed *in vitro* has been described by Lunde and Jacobs (1985). These authors showed the extinc-

tion of reactivity with anti-bradyzoite serum after a few days of bradyzoites cultivation *in vitro*. But they could not analyze precisely the conversion due to the lack of stage-specific probes. In the present study, we could follow the differentiation at the molecular level with stage-specific MAbs that allowed us to determine precisely when the antigenic conversion begins; we could also observe bradyzoite antigen expression before the formation of cysts, which had usually been the criterion of identification of these stages *in vitro* (Shimada *et al.* 1974; Darde *et al.* 1989).

The differentiation of bradyzoites (BQNC2 and 76K strains) into tachyzoites occurs through an intermediate stage coexpressing bradyzoite- and tachyzoite-specific proteins, a stage which is also found during the transformation of tachyzoites into bradyzoites. The existence of an intermediate stage is not surprising; it suggests that surface proteins are diluted and not immediately lost during the conversion. The patterns of gene activation or repression are yet to be established since we cannot conclude whether the biosynthesis of stage-specific molecules are mutually exclusive or coexist for some time.

The onset of differentiation toward the tachyzoite stage that we defined by the expression of P30 can begin before the parasite division: therefore it is not linked to division. Not all bradyzoites transform into tachyzoites since we could find multiplying bradyzoites.

During the differentiation of peritoneal tachyzoites (Prugniaud strain) into bradyzoites *in vitro,* the multiplication of parasites starts before the expression of bradyzoite-specific proteins. Within the time range of the experiment, bradyzoites derived *in vitro* from peritoneal tachyzoites were different from these obtained from brain cysts since these parasites which did not react for a SAG1-specific MAb were not recognized by a P21-specific MAb, which reacts with brain cyst bradyzoites. However, parasites reacting for P21-specific MAbs were found in long-term culture of the Prugniaud strain. This suggests that protein P21 is the last to appear during the transformation of tachyzoites into bradyzoites, and this is likely to happen later than 72 hr pi since we did not find it in the short-term kinetics. One can therefore assume that the trigger or threshold for gene activation is not the same for the four bradyzoite proteins.

The bradyzoite–tachyzoite interconversion is not synchronous within a cell culture and within a host cell since we could find different stages in the same cell culture and in the same host cell. Darde *et al.* (1989) had already observed this fact with the Prugniaud strain in an ultrastructural study. Moreover the existence of heterogenous vacuoles, i.e., heterogeneity of stages within a parasitophorous vacuole, suggests that differentiation is not synchronous within a cloned parasite population. Heterogenous vacuoles were also found in the long-term culture of BQNC2 and Prugniaud strain *in vitro*. This phenomenon is difficult to explain. It could suggest that internal factors can play a role in differentiation whereas only external factors had been supposed to be involved so far. Then parasites from an apparently homogenous population (bradyzoites obtained from brain cysts or tachyzoites obtained from peritoneal cavity) in the same culture condition can develop in different ways, which results in an heterogeneity of stages in the same host cell and most amazingly in the same parasitophorous vacuole.

Since transformation was not synchronous, we can only conclude from these data that a bradyzoite (BQNC2 strain) can transform into a tachyzoite in 48 hr and that a tachyzoite (Prugniaud strain) can give rise to bradyzoites in 72 hr, *in vitro* and in the absence of any immune factor. Whether the immune response of the host or an internal mechanism of the parasite is responsible for stage conversion *in vivo* remains to be in-

vestigated. That immunologic factors are not needed for the formation of bradyzoites *in vitro* was suggested previously by others (Hoff *et al.* 1977; Jones *et al.* 1986; Darde *et al.* 1989) but harvesting parasites *in vivo* and growing them *in vitro* can mimic a change occurring during building the immune response *in vivo*.

This study is a preliminary step in studying the determinism of the interconversion. The future goal is to determine factors which drive interconversion. Knowing these factors would allow manipulation of conversion toward either stage and would help with controlling toxoplasmic reactivation *in vivo*.

Acknowledgments

The authors are indebted to I. Briche, A. Loyens, and M. Mortuaire for excellent technical help. This work was funded by INSERM and CNRS and Agence Nationale de Recherche sur le SIDA (ANRS).

References

Cornelissen, A. W. C. A., Overdulve, J. P., and Hoenderboom, J. M. 1981. Separation of *Isospora* (*Toxoplasma*) *gondii* cysts and cystozoites from mouse brain tissue by continuous density-gradient centrifugation. *Parasitology* **81**, 103–108.

Couvreur, G., Sadak, A., Fortier, B., and Dubremetz, J. F. 1988. Surface antigens of *Toxoplasma gondii*. *Parasitology* **97**, 1–10.

Darde, M. L., Bouteille, B., Leboutet, M. J., Loubet, A., and Pestre-Alexandre, M. 1989. *Toxoplasma gondii:* Étude ultrastructurale des formations kystiques observées en culture de fibroblastes humains. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée* **64**, 403–411.

Frenkel, J. K. 1973. Toxoplasmosis: Parasite life cycle, pathology and immunology. *In* "The *Coccidia, Eimeria, Isospora, Toxoplasma* and Related Genera" (D. M. Hammond and P. L. Long, Eds.), pp. 343–410. University Park Press, Baltimore.

Frenkel, J. K., Nelson, B. M., and Arias-Stella, J. 1975. Immunosuppression and toxoplasmic encephalitis: Clinical and Experimental aspects. *Human Pathology* **6**, 97–111.

Hoff, R. L., Dubey, J. P., and Frenkel, J. K. 1977. *Toxoplasma gondii* cysts in cell culture: New biologic evidence. *Journal of Parasitology* **63**, 1121–1124.

Jones, T. C., Bienz, K. A., and Erb, P. 1986. *In vitro* cultivation of *Toxoplasma gondii* cysts in asterocytes in the presence of gamma interferon. *Infection and Immunity* **51**, 146–156.

Laugier, M. N., and Quilici, M. 1970. Interêt experimental d'une souche de toxoplasme peu pathogène pour la souris. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée* **45**, 389–403.

Lunde, M. N., and Jacobs, L. 1985. *Toxoplasma* cystozoite antigenic change in tissue culture. *Journal of Parasitology* **71**, 833.

Martrou, P., Pestre-Alexandre, M., Loubet, R., Nicolas, J. A., and Malinvaud, G. 1965. La toxoplasmose congénitale (note concernant un cas mortel). *Limousin Medical* **53**, 3–7.

Shimada, K., O'Connor, R., and Yoneda, C. 1974. Cyst formation by *Toxoplasma gondii* (RH strain) *in vitro*. *Archives of Ophthalmology* **92**, 496–500.

Tomavo, S., Fortier, B., Soete, M., Ansel, C., Camus, D., and Dubremetz, J. F. 1991. Characterization of bradyzoite—specific antigens of *Toxoplasma gondii*. *Infection and Immunity* **59**, 3750–3753.

Received 19 August, 1992; accepted with revision 17 December 1992

EXPERIMENTAL PARASITOLOGY 78, 361–370 (1994)

Experimental Induction of Bradyzoite-Specific Antigen Expression and Cyst Formation by the RH Strain of *Toxoplasma gondii in Vitro*

MARTINE SOÊTE,[1] DANIEL CAMUS, AND JEAN FRANÇOIS DUBREMETZ

INSERM Unité 42, Biologie et biochimie parasitaires et fongiques, 369 rue Jules Guesde BP 39, 59 651 Villeneuve d'Ascq, France

SOÊTE, M., CAMUS, D., AND DUBREMETZ, J. F. 1994. Experimental induction of bradyzoite-specific antigen expression and cyst formation by the RH strain of *Toxoplasma gondii in vitro*. *Experimental Parasitology* 78, 361–370. The differentiation of *Toxoplasma gondii* tachyzoites into bradyzoites has been studied experimentally *in vitro* using the virulent RH strain. The differentiation was monitored by immunofluorescence detection of stage-specific proteins by monoclonal antibodies and by electron microscopy. The expression of bradyzoite-specific proteins has been induced by modifying the culture conditions in any of the following three ways: increasing the pH of the culture medium (pH 8), shifting temperature from 37 to 43°C, or performing a sodium arsenite treatment. Interferon-γ, described as involved in the control of toxoplasmosis *in vivo*, was inefficient to trigger bradyzoite proteins expression in HFF host cells *in vitro*. The pH increase and heat treatment, but not the sodium arsenite, induced the formation of cysts whose fine structure was similar to that of cysts found in the brain of mice infected by avirulent strains. Our results therefore show that the tachyzoite–bradyzoite switch is not directly dependent on an immunomodulator, but is likely to arise from an alteration of the environment of the host cell–parasite complex. © 1994 Academic Press, Inc.

INDEX DESCRIPTORS AND ABBREVIATIONS: *Toxoplasma gondii;* Protozoa; Coccidia; Cysts; Virulent strain; Differentiation: *in vitro;* Minimum essential medium (MEM); Fetal calf serum (FCS); Human foreskin fibroblast (HFF); Immunofluorescence assay (IFA); Electron microscopy (EM); Interferon (IFN); Monoclonal antibody (mAb); Postinfection (p.i.).

INTRODUCTION

The bradyzoite–tachyzoite interconversion is a crucial event in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. Tachyzoites are responsible for the acute phase of the infection, which is usually rapidly overcome by the immune defenses of the host. Then the parasite develops a chronic phase characterized by the encystment of the bradyzoites in tissues such as those of brain or muscle. When immunosuppression occurs, as in AIDS, bradyzoites can give rise to tachyzoites that reactivate the infection, which may eventually lead to death (Frenkel *et al.* 1975; Navia *et al.* 1986). The mechanisms that control the interconversion are not known. Although the immune system is believed to play a part in this phenomenon *in vivo*, studies *in vitro* have shown that immunologic factors are not required for cyst formation. Indeed, some *Toxoplasma* strains that produce chronic infection in mice can spontaneously develop both tachyzoites and bradyzoites in the same culture (Darde *et al.* 1989; Soête *et al.* 1993), but one has no control over this differentiation. In order to understand better this phenomenon, we have run experiments aiming at modulating differentiation *in vitro* using stage-specific monoclonal antibodies as markers of tachyzoites or bradyzoites. We have used the virulent RH strain, which had never been shown to form cysts spontaneously *in vitro*. In this paper, we show that this strain expresses bradyzoite-specific proteins and forms cysts *in vitro*, in the absence of added immunologic factors, when

[1] To whom correspondence should be addressed.

0014-4894/94 $6.00
Copyright © 1994 by Academic Press, Inc.
All rights of reproduction in any form reserved.

a metabolic or physical stress on the infected cells is caused by altering the cell culture conditions.

Materials and Methods

Strain of Toxoplasma

We have used the RH strain (Sabin and Feldman, 1946) that was passaged every 3 days by intraperitoneal inoculation of parasites in mice.

Cells

Vero cells (African green monkey kidney cells) were grown at 37°C under 5% CO_2/air in Dulbecco minimum essential medium (Seromed), pH 7.4, supplemented with antibiotics (penicillin/streptomycin) and 5% fetal calf serum (FCS).

Human foreskin fibroblasts (HFF; originally developed by Dr. E. Pfefferkorn and obtained from Dr. D. Roos) were also used. They were grown in α-MEM supplemented with antibiotics and 10% FCS under conditions identical to those for the Vero cells.

Experimental Procedures for in Vitro Differentiation

For all experiments, RH tachyzoites were harvested from the peritoneal cavity of infected mice. They were washed in culture medium and inoculated on cells after resuspension in the cell culture medium. Cells were grown on 12-mm glass coverslips in four-well chambers for immunofluorescence assay (IFA) or on the bottom of six-well chambers for electron microscopy (EM).

pH modifications. Six hours after infection, the culture medium was removed and replaced with a modified medium consisting of RPMI 1640 (Boehringer-Mannheim) with 5% FCS, 50 m*M* Hepes (Sigma), and 2 g/liter $NaHCO_3$, adjusted to pH 8 with NaOH. The cultures were maintained at 37°C in air to avoid pH variation due to CO_2. In the control culture, the medium was replaced with normal culture medium, pH 7.4, with 5% FCS, and infected cells were grown in 5% CO_2/air.

Temperature shift. Vero cells, seeded on glass coverslips placed in 25-cm^2 culture flasks, were pretreated for 2 hr at 43°C and returned to 37°C for 1 hr. Then tachyzoites were added and allowed to invade the cells for 2 hr. The infected cells were returned to 43°C for 12 to 48 hr, depending on the experiments, and then returned to 37°C until the end of the experiment. Controls were maintained at 37°C throughout. The first heat shock to 43°C, 2 hr before the infection, allowed the cells to acquire a thermotolerance for the second heat shock (Selawry *et al.* 1957; Henke and Dethlefsen 1978). Indeed, without this pretreatment, the cells would not resist a long period of heating to 43°C.

Sodium arsenite. Na arsenite is a chemical stress inducer (Li 1983). Four hours after infection of HFF or Vero cells with tachyzoites, the culture medium was removed and replaced with fresh medium (α-MEM with 2% FCS) containing Na arsenite at concentrations ranging from 10^{-5} to 5×10^{-7} *M* or none at all. The treatment was maintained until the end of the experiment.

Interferon-γ (IFN-γ). HFF were pretreated with 150 U/ml of human recombinant IFN-γ (Roussel Uclaf) in α-MEM with 5% dialyzed fetal calf serum for 24 hr before infection. Parasites were then added for 4 hr in normal medium. Then the medium was removed and the infected cells were treated again with the same concentration of IFN-γ until the end of the experiment (36 or 96 hr).

IFA

The coverslips were fixed in 2% paraformaldehyde in PBS for 30 min at various times after infection. The cells were permeabilized in acetone at −20°C. A double IFA was used to detect bradyzoite- and tachyzoite-specific proteins on the same coverslips (Soête *et al.* 1993). The infected cells were incubated first with a bradyzoite-specific mAb (anti-P36 anti-P34, anti-P21, or anti-P18) (Tomavo *et al.* 1991) diluted 1/100, washed in PBS, and incubated with fluorescein-conjugated goat anti-mouse IgG diluted 1/200. In a second step, the cells were incubated with a biotinylated tachyzoite-specific mAb (anti-P30) (Couvreur *et al.* 1988) diluted 1/500, washed in PBS, and incubated with sulforhodamine streptavidin (Boehringer-Mannheim) diluted 1/200. Observations were performed on a Zeiss Axiophot microscope equipped for epifluorescence.

All counts were performed at 40× on monolayers labeled for P30 (SAG1) and P36 and on 50 fields for each coverslip.

Electron Microscopy

The infected monolayers were fixed for 1 hr in 2.5% glutaraldehyde in 0.1 *M* Na cacodylate buffer, pH 7.3, washed in the same buffer, and postfixed for 1 hr in 1% osmium tetroxide in the same buffer. They were then dehydrated in ethanol–propylene oxide and embedded in Epon. Embedded material was sectioned with a diamond knife and contrasted with uranyl acetate and lead hydroxide. Sections were observed with a Hitachi H600 electron microscope.

Results

We have evaluated the induction of bradyzoite protein expression by RH tachyzoites in two cells types and under four different treatments: pH change, heat shock, chemical stress, and interferon-γ.

We have also studied the formation of cysts under these conditions.

Bradyzoite protein expression was assayed by double IFA: three types of vacuoles could be observed in which the parasite expressed either only P30 (tachyzoite-specific protein) or P30 together with bradyzoite-specific proteins (P36, P34, and P18) or only bradyzoite-specific proteins. The last type was found only late in the experiment and was never present within the first 48 hr, during which all counting was performed. Therefore, all parasites expressed P30, which was used as the marker for total population. Quantification was made using the P36 bradyzoite-specific antibody. We have recorded the total number of vacuoles and the number of vacuoles in which parasites expressed bradyzoite proteins, respectively, in control and treated culture. The percentage of differentiation (vacuoles expressing bradyzoite-specific proteins) was then calculated relative to the total number of vacuoles in the control. This procedure was used to account for the decrease in parasitemia in some treated cultures; indeed, the treatment could have selected differentiating parasites, which would artifactually increase the percentage of differentiation. Comparative assays could not be extended beyond 48 hr because of the rupture of infected cells and reinvasion that occurred after this time, especially in control cultures.

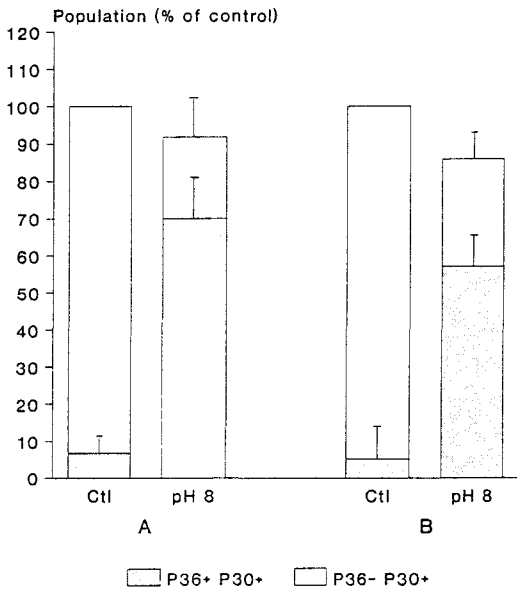


FIG. 1. Alkaline pH/Vero. The infected Vero cells were treated with pH 8 medium starting 4 hr after infection. Graph A is the mean of three successive experiments in which one coverslip was counted in each case (standard deviation is given); cells were fixed for IFA 48 hr p.i. Graph B is a single experiment in which the values are the means of three coverslips in each case (standard deviation is given); cells were fixed for IFA 33 hr p.i. Ctl, control; pH 8, infected cells treated with pH 8 medium. Each bar represents the total parasite population of a sample as a percentage of the total population in the control. The shaded area of each bar is the part of the population expressing the bradyzoite-specific protein P36.

Alkaline Treatment

The alteration of culture medium pH induced differentiation when basic pH was used (Fig. 1). Acidic pH (between 6.8 and 7) had no effect (data not shown). At pH 8 and at 48 hr p.i., about 70% of the vacuoles contained parasites expressing P30 and bradyzoite-specific proteins. This occurred both in Vero cells and in HFF (Fig. 2). In control cultures, some doubly labeled parasites were always found, ranging from 0 to 10%, depending on the experiment. At 96 hr p.i., in control cultures, the cells were almost completely destroyed by the active multiplication of the tachyzoites. At the same time, we could observe only a few foci of multiplication of tachyzoites and a majority of mixed parasites in pH 8 medium. If we extended the culture in pH 8 medium beyond 96 hr, we also observed parasites expressing no SAG 1, but only bradyzoite-specific proteins. However, the bradyzoite protein P21 was not expressed. In phase contrast, the SAG1-negative vacuoles looked different from parasitophorous vacuoles where SAG1 was expressed. The parasites were tightly packed, and a cyst wall was observed. The study using electron microscopy (Fig. 3) showed a morphology

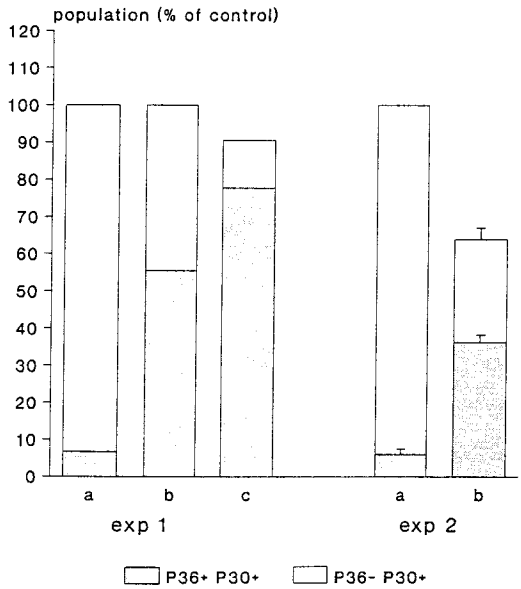


FIG. 2. Alkaline pH/HFF. In each experiment, infected HFF were treated with pH 8 medium starting 4 hr after infection. In experiment 1, the values are the mean of two coverslips for each case. In experiment 2, the values are the means of three coverslips (standard deviation is given). Bars a, controls; bars b, infected cells fixed for IFA at 33 hr p.i.; bar c, 48 hr p.i. Bars and shading as in Fig. 1.

similar to that of cysts found in the brain of mice infected with avirulent strains of *T. gondii*. The cyst wall was usually limited by an undulating unit membrane doubled on its inner side by a layer of membranous tubules, and vesicles, apparently derived from or connected to the membrane, and the parasites inside the cyst were embedded in a granular material. However, in our preparations, most of the parasites did not contain the large amount of micronemes and amylopectin granules that is characteristic of bradyzoites from brain cysts, and some organisms showed evidence of endodyogeny.

Heat-Shock Treatment

The temperature shift from 37 to 43°C also induced differentiation (Fig. 4). The more we extended the duration of the second heat treatment, the larger was the amount of cyst-like structures that could be collected. We obtained the maximum of vacuoles containing doubly labeled parasites (about 45%) with a heating period of 48 hr. The number was slightly lower than with alkaline conditions. However, some of the parasites were lost in the treated cultures, due to a lower rate of invasion after heat shock, to loss of cells during the 48 hr, or to parasite killing. We may therefore have underestimated the percentage of transformation in this case by reporting the total number in control. Alkaline medium did not cause such losses. When cells were returned to 37°C after the 48 hr treatment, we could also observe cysts in which parasites expressed no P30 after about 6 days of culture. If we extended the culture, the remaining tachyzoites eventually lysed the cells by their active propagation.

Cysts could be isolated from a culture treated by heat or alkaline pH. The cells were scraped and lysed with a Dounce homogenizer. We obtained free parasites and cysts (Fig. 5) that sedimented with low-speed centrifugation (1000 rpm, 5 min). Their morphology at the light microscope level was similar to that of cysts purified from the brain of mice infected with nonvirulent strains. Their size ranged from 10 to 50 μm.

Chemical Stress Inducer: Na Arsenite

We also assayed a chemical stress on infected cells, using sodium arsenite. For concentrations of Na arsenite (2×10^{-6} and 10^{-6} *M*) that did not kill infected cells, we could observe a high level of expression of bradyzoite-specific proteins as early as 34 hr p.i., without significant loss of parasites compared to the control (Figs. 6 and 7). For concentrations below 10^{-6} *M*, we observed less expression of bradyzoite-specific proteins. Very few cysts were obtained by extending the culture under arsenite treatment: after 6 days of culture, we

FIG. 3. Intracellular RH cyst-like structure from culture treated with alkaline pH using EM (×36,800). Asterisk, granular material within the cyst; HC, host cell. Inset at lower right: detail of the enclosed area, showing the unit membrane of the wall cyst (arrows) (×96,000).

found essentially large vacuoles or foci of parasites expressing both P30 and bradyzoite-specific proteins and only a few cyst-like vacuoles that showed an extinction of P30 expression. No cysts were found by electron microscopy. Cadmium treatment was also used, but it did not induce expression of bradyzoite-specific proteins when the cells resisted the treatment (data not shown).

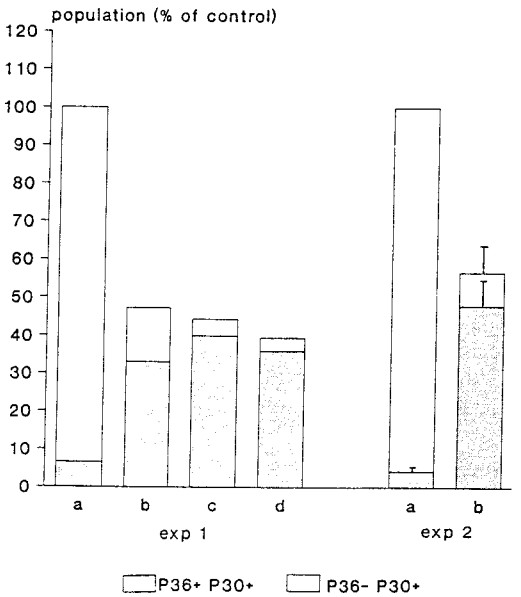


FIG. 4. Heat treatment (shift from 37 to 43°C). In each experiment, the Vero cells were preheated for 2 hr to 43°C. Infection was performed at 37°C. The infected cells were then returned to 43°C for 12 hr (bar b), for 18 hr (bar c), or for 24 hr (bar d) in experiment 1 and for 48 hr (bar b) in experiment 2. Bars a are the control. In experiment 1 one coverslip was counted in each case. In experiment 2 the values are the means of three coverslips (standard deviation is given). In all cases, infected cells were fixed for IFA 48 hr p.i. Bars and shading as in Fig. 1.

Interferon-γ

We observed in some cases a slight increase in the percentage of mixed parasites when cells were treated with IFN-γ after infection (Fig. 8). However, the most striking effects were the inhibition of parasite growth and a strong decrease in the total number of vacuoles. Cells were not affected by the treatment and the decrease observed is therefore actually related to parasite elimination. No cysts were found by extending the duration of the culture.

DISCUSSION

Some nonvirulent strains of *Toxoplasma* can produce both bradyzoites and tachyzoites in cell culture. However, bradyzoite production is usually extremely low and cannot be controlled (Bohne *et al.* 1993; Soête *et al.* 1993). The rapid multiplication of tachyzoites often prevents cyst formation by lysing the cell monolayers. In a previous study, Jones *et al.* (1986) reported the production of cysts *in vitro* in the presence of IFN-γ, which inhibited the tachyzoite multiplication, but this needed long-term cultures in astrocyte cells. Our goal was to develop a reproducible method for inducing the differentiation of tachyzoites into bradyzoites. During a previous study on the "spontaneous" differentiation of nonvirulent strains of *Toxoplasma gondii in vitro* (Soête *et al.* 1993), we had observed that parasites expressing bradyzoite proteins were more abundant in cell cultures grown under deleterious conditions. We therefore decided to investigate the effect of medium alterations on *T. gondii* differentiation. As many strains show some spontaneous cyst formation *in vitro,* we chose to use the RH strain, which had never been shown to produce cysts spontaneously *in vitro*. There

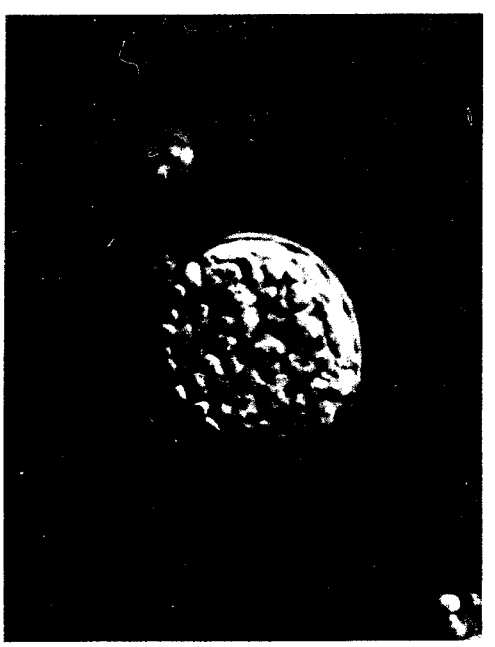


FIG. 5. Cyst purified from a heat-treated culture (differential interferential contrast, ×1500).

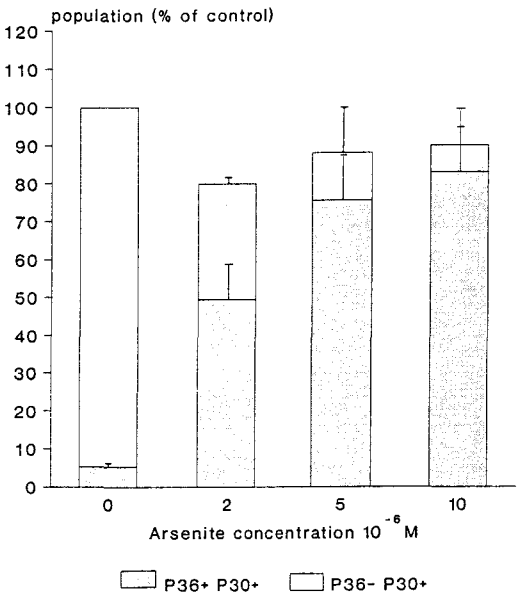


FIG. 6. Sodium arsenite/Vero. Infected Vero cells were treated with sodium arsenite 4 hr starting after infection. They were fixed for IFA 33 hr p.i. The values are the means of three coverslips in each case (standard deviation is given). Bars and shading as in Fig. 1.

was one report describing the formation of structures looking like cysts *in vitro* by RH grown in the presence of anti-toxoplasma serum and complement (Shimada *et al.* 1974). *In vivo* production of cysts had been reported in mice after immunization (Yano and Nakabayashi 1984) and in rats (Lecomte *et al.* 1992). In our hands, no spontaneous cyst formation was obtained with RH. However, to our surprise, when using our probes, defined as bradyzoite-specific because they never reacted with RH tachyzoites isolated from the peritoneal cavity of mice, some reacting parasites were observed in normal culture medium. These were always a low percentage of the total population, and it was restricted to dual expression of SAG1 and bradyzoite molecules; no SAG1-negative parasites were found. However, as we always used peritoneal tachyzoites as inoculum, this means that the *in vitro* development did not exactly match the conditions occurring in the nonimmune host.

The alkalinization of culture medium to pH 8 or the raising of the temperature to 43°C induced the expression of bradyzoite-specific proteins and production of RH cysts *in vitro*. The cysts found were similar to these observed *in vivo* in the brain of infected mice (Ferguson and Hutchinson 1987). However, some bradyzoite features (e.g., large amount of amylopectin granules) were not found. In addition, the P21 bradyzoite-specific protein was never found. It is interesting to note that this protein is found less frequently than the other bradyzoite-specific proteins in chronic strains such as Prugniaud, maintained *in vitro* (Soête *et al.* 1993). The absence of detection of the P21 in the RH strain suggests that the cysts formed *in vitro* were not fully mature, which is also consistent with

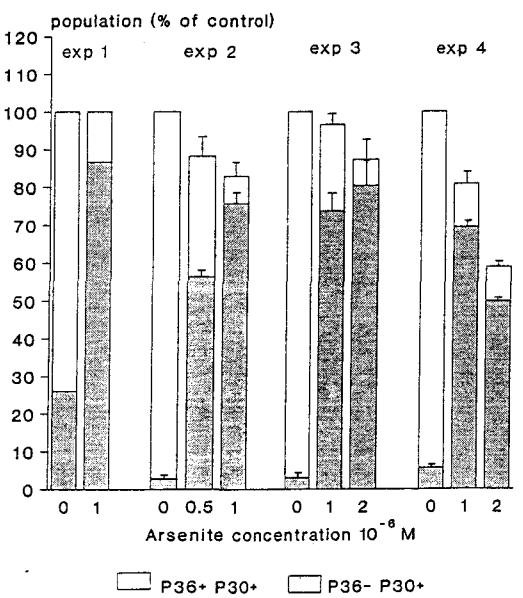


FIG. 7. Sodium arsenite/HFF. In each experiment, sodium arsenite treatment started 4 hr after infection. The infected HFF were fixed for IFA 33 hr p.i. Four different experiments are shown. In experiment 1, one coverslip was counted in each case. In experiments 2, 3, and 4, the values are the means of three coverslips for each case (standard deviation is given). Bars and shading as in Fig. 1.

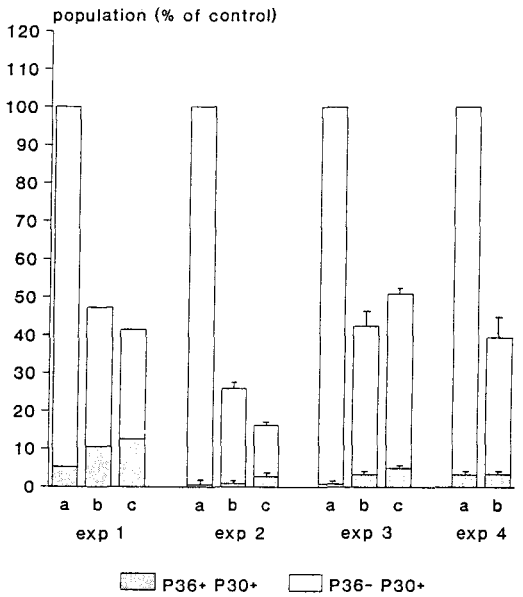


FIG. 8. Interferon-γ. In each experiment, HFF were treated with 150 U/ml of γ IFN for 24 hr previous to and 4 hr after infection (bars b and c). Bars a, controls; bars b, infected cells fixed for IFA 48 hr p.i.; bars c, 96 hr p.i. In experiment 1, the values are the means of two coverslips. In experiments 2, 3, and 4, the values are the means of three coverslips (standard deviation is given). Bars and shading as in Fig. 1.

the zoite structure, that RH has lost the gene coding for this protein, or that P21 is modified and is not recognized by our monoclonal antibody. This remains to be investigated.

Arsenite treatment was also efficient enough to trigger the expression of bradyzoite-specific proteins, but was too inefficient to induce cyst formation. This suggests that different mechanisms may be involved in the differentiation process or that cyst formation is a multistep process. Bradyzoite-specific protein expression may not always correlate with the encystment of the parasite.

As heat shock or a chemical stress allowed the expression of bradyzoite-specific proteins, we cannot exclude the possibility that these proteins could be stress proteins. However, encystation of *Giardia lamblia* leads to expression of antigens belonging to families of conserved stress proteins (Reiner *et al.* 1992). The cloning and sequencing of these proteins could help answer this question.

All these treatments shared a common feature: they slowed down the growth of both the host cells and the parasite. However, the actual target of these effectors in triggering bradyzoite expression, i.e., the tachyzoite or the host cell, remains to be determined. When we pretreated the cells with the alkaline medium or heat shocked the cells and removed the stress at the time of infection, we did not obtain any significant differentiation (data not shown). This suggested that the parasite could be reacting directly to the treatment. However this is far from conclusive and the hypothesis that says that the alteration of host cell metabolism is the trigger acting on the parasite is also attractive.

The cell type or origin is not of a critical importance in cyst development since we could obtain cysts in two different cell lines. The alteration of the host cell metabolism must therefore be a general phenomenon to be the trigger. We will have to use cells insensitive to these treatments to test their possible direct effect on the parasite.

Under our experimental conditions, interferon-γ was almost ineffective in triggering differentiation, whereas it eliminated a large amount of the intracellular parasites. Indeed, significant increases in differentiation could be deduced when the transformation in the treated sample was reported as the total number of parasites remaining in the treated culture. However, taking into account the data obtained *in vivo* (Suzuki *et al.* 1988), we consider that IFN-γ is likely to induce a selective killing of tachyzoites. This is further strengthened by the lack of cyst formation in IFN-γ treated cultures. Experiments by Jones *et al.* (1986) also suggested that IFN-γ did not induce cyst formation in astrocyte culture, but decreased the multiplication of the tachyzoites and therefore selected differentiating parasites

that would otherwise be diluted in the exponentially growing tachyzoites. A recent paper (Bohne *et al.* 1993) described the induction of bradyzoite-specific proteins in IFN-γ-treated mouse macrophages. The way in which IFN acts in macrophage is probably different from that of what acts on HFF; the tryptophane starvation that is the effect of IFN-γ on HFF (Pfefferkorn *et al.* 1986) is probably not occurring in macrophages and could explain the differences in results. We therefore conclude that interferon-γ is not an efficient effector of the differentiation of RH in HFF *in vitro*. This also suggests that cyst formation is not a direct consequence of inhibition of parasite growth.

In vivo, IFN-γ is described as the major mediator of resistance against *T. gondii* (Suzuki *et al.* 1988), but its actual role is unknown in the complex network of interaction between the immune system and the parasite. The heat, alkaline, or arsenite treatment could mimic the action of immunologic effectors *in vivo*. An alternative hypothesis is that stress proteins could be involved since a relationship in hyperthermia exists between stress (heat shock) protein accumulation in the central nervous system and cell stress and damage (Tytell *et al.* 1993). The hyperthermia induced by parasite infection cannot be excluded as a possible trigger of the encystment of the parasite.

The present work shows that it is possible to modulate bradyzoite and cyst formation by *T. gondii in vitro*. The results obtained with the RH strain have been extended to nonvirulent strains in which transformation is even more efficient and almost reaches complete extinction of SAG1 expression (data not shown). This will facilitate the production of bradyzoite for studying its structure and properties and will indeed allow investigation of the mechanism of the switch between stages and therefore the regulation of stage-specific gene expression, which remains a major issue in the understanding of the disease under immunodeficiency.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to D. Dive, P. Delplace, and C. Slomiany for advice and discussions and to A. Loyens for clever technical assistance. This work was supported by INSERM and the Association Nationale de la Recherche contre le SIDA (ANRS).

REFERENCES

BOHNE, W., HEESEMANN, J., AND GROSS, U. 1993. Induction of bradyzoite-specific *Toxoplasma gondii* antigens in gamma interferon treated mouse macrophages. *Infection and Immunity* **61**, 1141–1144.

COUVREUR, G., SADAK, A., FORTIER, B., AND DUBREMETZ, J. F. 1988. Surface antigens of *Toxoplasma gondii*. *Parasitology* **97**, 1–10.

DARDE, M. L., BOUTEILLE, B., LEBOUTET, M. J., LOUBET, A., AND PESTRE-ALEXANDRE, M. 1989. Toxoplasma gondii: Etude ultrastructurale des formations kystiques observées en culture de fibroblastes humains. *Annalles de Parasitologie Humaine et Comparée* **64**, 403–411.

FERGUSON, J. P., AND HUTCHINSON, W. M. 1987. The host–parasite relationship of *Toxoplasma gondii* in the brains of chronically infected mice. *Virchows Archiv A* **411**, 39–43.

FRENKEL, J. K., NELSON, B. M., AND ARIAS-STELLA, J. 1975. Immunosuppression and toxoplasmic encephalitis: Clinical and experimental aspects. *Human Pathology* **6**, 97–111.

HENKE, K., AND DETHLEFSEN, L. 1978. Heat fractionation and thermotolerance: A review. *Cancer Research* **38**, 1843–1851.

JONES, T. C., BIENZ, K. A., AND ERB, P. 1986. *In vitro* cultivation of *Toxoplasma gondii* cysts in asterocytes in the presence of gamma interferon. *Infection and Immunity* **51**, 146–156.

LECOMTE, V., CHUMPITAZI, B. F. F., PASQUIER, B., AMBROISE-THOMAS, P., AND SANTORO, F. 1992. Brain-tissue cysts in rats infected with the RH strain of *Toxoplasma gondii*. *Parasitology Research* **78**, 267–269.

LI, G. C. 1983. Induction of thermotolerance and enhanced heat shock protein synthesis in Chinese hamster fibroblasts by sodium arsenite and by ethanol. *Journal of Cell Physiology* **115**, 116–122.

NAVIA, B. A., PETITO, C. K., GOLD, J. W., CHO, E.-S., JORDAN, B. D., AND PRICE, R. W. 1986. Cerebral toxoplasmosis complicating the acquired immune deficiency syndrome: Clinical and neuropathological findings in 27 patients. *Annals of Neurology* **19**, 224–238.

PFEFFERKORN, E. R., ECKEL, M., AND REBHUN, S. 1986. Interferon gamma suppresses the growth of

Toxoplasma gondii in human fibroblasts through starvation of tryptophan. *Molecular and Biochemical Parasitology* **20**, 215–224.

REINER, D. S., SHINNICK, T. M., ARDESHIR, F., AND GILLIN, F. D. 1992. Encystation of *Giardia lamblia* leads to expression of antigens recognized by antibodies against conserved heat shock proteins. *Infection and Immunity* **60**, 5312–5315.

SABIN AND FELDMAN, 1946.

SELAWRY, O. S., GOLDSTEIN, M. N., AND MACCORMIK, T. 1957. Hyperthermia in tissue-cultured cells of malignant origin. *Cancer Research* **17**, 785–791.

SHIMADA, K., O'CONNOR, R., AND YONEDA, C. 1974. Cyst formation by *Toxoplasma gondii* (RH strain) *in vitro*. *Archives of Ophthalmology (Chicago)* **92**, 496–500.

SOÊTE, M., FORTIER, B., CAMUS, D., AND DUBREMETZ, J. F. 1993. *Toxoplasma gondii:* Kinetics of bradyzoite–tachyzoite interconversion *in vitro*. *Experimental Parasitology* **76**, 259–264.

SUZUKI, Y., ORELLANA, M. A., SCHREIBER, R. D., AND REMINGTON, J. 1988. Gamma interferon: The major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. *Science* **240**, 516–518.

TOMAVO, S., FORTIER, B., SOÊTE, M., ANSEL, C., CAMUS, D., AND DUBREMETZ, J. F. 1991. Characterization of bradyzoite-specific antigens of *Toxoplasma gondii*. *Infection and Immunity* **59**, 3750–3753.

TYTELL, M., BARBE, M. F., AND BROWN, I. R. 1993. Stress (heat shock) protein accumulation in the central nervous system. *Advances in Neurology* **59**, 293–303.

YANO, K., AND NAKABAYASHI, T. 1984. Delayed secondary immune response in mice immunized with *Toxoplasma* antigens and its effect for protection against *Toxoplasma gondii*. *Zentralblatt fuer Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene, Abt. 1, Originale A* **256**, 381–389.

Received 8 October 1993; accepted with revision 4 February 1994