

N°d'ordre :

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE

THESE DE DOCTORAT

**Pour l'obtention du grade de Docteur en Sciences de la Vie et de la Santé
Présenté à l'université de Lille I par**

BEAUCHAMPS Patrick

CONTRIBUTION DE L'AMPLIFICATION GENIQUE (PCR) AU DIAGNOSTIC DE LA TOXOPLASMOSE INTERETS DE LA PCR QUANTITATIVE



Soutenue le 13 Décembre 1999

| | |
|----------------------|---|
| Président : | Professeur R. CACAN |
| Rapporteurs : | Docteur J.F. DUBREMETZ Docteur C. DISSOUS |
| Examineurs : | Docteur M.F. CESBRON-DELAUW Docteur B. TOURVUSILLE |

L'homme espèce biologique, l'homme dépendant de la biodiversité et cause de son érosion accélérée, l'homme responsable devant les générations futures de sa gestion des ressources de la planète.

Le mode de vie parasitaire représente la conquête de la vie par la vie.

A l'ère de la biodiversité, la parasitologie, renouvelée par le concept d'interaction durable et enrichie par les percées de la biologie moléculaire, est donc appelée à devenir *la* biologie générale du XXI^{ème} siècle

R. BARBAULT (1998)

A mes parents

A Ghislaine et Marc

A mes trois p'tits bouts, Jessica, Quentin et Cyril

Et surtout à toi, Chrystèle

Je tiens à exprimer mes plus sincères remerciements à :

Monsieur René CACAN d'avoir accepté la présidence de ce jury.

Monsieur Jean-François DUBREMETZ d'avoir spontanément accepté d'être membre de ce jury.

Madame Colette DISSOUS d'avoir aimablement accepté de juger ce travail.

Marie-France CESBRON-DELAUW de m'avoir accueilli au sein de son unité de recherche. Vos compétences scientifiques, vos critiques constructives et votre patience ont été une aide déterminante dans la réalisation de ce mémoire.

Madame Beatrice TOURVIEILLE. A toi qui m'as soutenu et qui m'as accordé ta confiance tout au long de ce véritable Marathon, aucun mot ne sera suffisamment fort pour exprimer toute ma reconnaissance. **Mille mercis**, je n'oublierai jamais toutes ces innombrables heures passées ensemble.

Monsieur le Professeur André CAPRON qui m'a accordé toute sa confiance et qui m'a permis de découvrir un "nouveau monde" : la Parasitologie. Que ce travail soit le témoignage de ma reconnaissance et de ma profonde admiration.

Madame Françoise DARCY pour votre enthousiasme, votre gentillesse et votre grande disponibilité qui m'ont été autant d'encouragement. Soyez assurée de ma profonde estime et de toute mon amitié.

Claudie VERWAERDE pour ses conseils scientifiques si précieux. Grâce à toi, *Plasmodium* ne m'est plus inconnu.

Isabelle WOLOWCZUC pour toutes nos discussions enrichissantes.

Monsieur Jean-Pierre KURSNIERZ pour tous nos échanges sympathiques et pour la qualité de la synthèse des oligonucléotides.

Monsieur Christian DROLEZ et Monsieur Jean-Marc MERCHEZ pour les supports iconographiques illustrant ce travail

Josette FONTAINE, Marie-Pierre FOURMAUX, Anita CARON, Sophia LAFITTE, Anne-Marie SCHACHT, Didier DESLE, Marc LOYENS, Jacques TROLET et Jean-Loup NEYRINCK pour leurs conseils techniques, leur gentillesse et leur bonne humeur.

Madame Jacqueline DERICK pour son dévouement dans l'obtention des supports bibliographiques.

Je tient également à remercier le personnel des secrétariats et de la production des parasites, les Dames de la laverie, pour leur aide et leur disponibilité .

A tous ceux qui de près ou de loin ont contribué à l'aboutissement de ce travail,

un grand *Merci*

Ce travail a été réalisé à l'institut Pasteur de Lille dans l'Unité Mixte IINSERM U167-CNRS 624 sous la direction de Monsieur le Professeur André CAPRON puis dans l'Unité "Bases moléculaires de la Pathogénèse des Sporozoaires" sous la direction de Madame le Docteur Marie-France CESBRON-DELAUW et a été financé par la société Diagnostic Pasteur.

RESUME

La toxoplasmose est une parasitose ubiquitaire occupant une large place en médecine humaine et vétérinaire. Cette affection parasitaire très fréquente en France est le plus souvent bénigne voire asymptomatique. Pourtant, elle reste redoutable en situation de transmission congénitale. De même, sa survenue chez les malades immunodéprimés a radicalement changé la conception de cette maladie. Pour compenser les insuffisances du sérodiagnostic et du diagnostic parasitologique, nous avons mis au point un diagnostic permettant un dépistage très précoce face à la suspicion d'une toxoplasmose congénitale ou cérébrale. Ce diagnostic repose sur l'amplification spécifique d'un gène répété 35 fois de *Toxoplasma gondii* (gène B1) associé à un système de révélation par chimioluminescence. A partir de prélèvements comparables aux liquides amniotiques humains, nous sommes capables de détecter spécifiquement un tachyzoïte.

Nous avons également mis au point un modèle de PCR quantitative sur ADN utilisant un standard interne compétitif et spécifique des gènes *SAG1*, B1 et ARN 18S. Ce modèle est applicable à tout modèle d'étude expérimental où la quantification d'une charge parasitaire est nécessaire. Nos premiers essais ont porté sur la quantification d'une charge parasitaire cérébrale (kyste, souche Prugniaud) dans un modèle murin (BALB/C et C57 BI/6) d'encéphalite toxoplasmique.

Afin de documenter une éventuelle corrélation entre l'expression des gènes de granules denses et la virulence des différentes souches du parasite, nous avons élaboré l'ensemble des outils techniques d'un modèle de RT-PCR quantitative pour le gène *GRA2* (gène reconnu être impliqué dans le pouvoir pathogène). Ce système utilise une molécule standard interne compétitive, différente de 4 paires de bases comparée à la cible génomique. Les produits PCR marqués à la fluorescéine par nested-PCR, seront quantifiés à l'aide d'un analyseur automatique d'ADN. Les variations de rendement d'amplification seront quant à elles, corrigées par la quantification d'un gène rapporteur (β tubuline).

A, C, G et T : Adénine, Cytosine, Guanine et Thymine
ADN et ADNc : Acide désoxyribonucléique et ADN complémentaire
ADS : Agglutination Directe sensibilisée
AES : Antigène d'excrétion-sécrétion
ANt : Acides nucléiques totaux
ARN, ARNm et ARNr: Acide ribonucléique, ARN messager et ARN ribosomal
BET : Bromure d'éthidium
CMV : Cytomegalo virus
CsCl : Chlorure de Césium
C_t : Threshold cycle
ELIFA : Enzyme linked immunofiltration
ELISA : Enzyme linked immunosorbend assay
EST : Expressed sequence Tag
FACS : Fluorescence activated cell sorter
FIV : Feline immunodeficiency virus
g, pg et fg : gramme, picogramme et femtogramme
Gamma GT : Gamma glutamyltransférase
GPI : Glycosylphosphatidylinositol
HIV ou VIH : Human immunodeficiency virus
HPLC : High pressure liquid chromatography
H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène
Hsp : Heat shock protein
IFI : Immunofluorescence indirecte
Ig : Immunoglobuline
IL : Interleukine
INF-γ : Interféron γ
IRM : Imagerie par résonance magnétique
ISAgA : Immunosorbend agglutination assay
kb : Kilobase
kDa : KiloDalton
LAK : Lymphokine activated killer
LDH : Lactate déshydrogénase
Log : Logarithme népérien
NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (forme réduite)
nb : Nombre
NK : Natural killer
NO : Monoxyde d'azote
O₂^{o-} : Anion superoxyde
OH^o : Radical hydroxyle

pb, kpb et Mpb et : Paire de bases, Mégapb et kilopb
PCR : Polymerase chain reaction
PCR-RFLP : PCR-polymorphism restriction fragment length
PEF : Penetration enhancing factor
polyA⁺ : Polyadénylé
PS I (ou PS II) : Complexe photosynthétique I
r : Rendement
RAPD-PCR : Random amplified polymorphic DNA -PCR
RFLP : Restriction fragment length polymorphism
RT : Reverse transcription
RT-PCR : Reverse transcription-polymerase chain reaction
SCID : Severe combined immunodeficient
SIDA : Syndrome d'immunodéficience acquise
TDM : Tomodensitométrie
TNF - α : Tumor necrosis factor α
ts : Mutant thermosensible

TABLE DES MATIERES

| | |
|---|-------------|
| INTRODUCTION | p 11 |
| I) GENERALITES | p 12 |
| A) Historique et Taxonomie | p 12 |
| B) <i>Toxoplasma gondii</i> : morphologies et cycle | p 13 |
| 1) Morphologie des différents stades infectieux du parasite | p 13 |
| a) Tachyzoïte | p 13 |
| b) Bradyzoïte, forme d'enkystement | p 16 |
| c) Sporozoïte et oocyste | p 17 |
| 2) Le cycle parasitaire | p 17 |
| a) Cycle de multiplication asexuée | p 17 |
| b) Cycle de reproduction sexuée | p 20 |
| C) Edifices moléculaires du toxoplasme | p 21 |
| 1) Organisation du génome | p 21 |
| a) L'ADN | p 21 |
| b) Nomenclature officielle des gènes clonés | p 23 |
| c) L'ARN | p 24 |
| 2) Fonctions et caractéristiques des produits traductionnels du toxoplasme | p 26 |
| a) Les molécules membranaires ou antigènes de surface | p 26 |
| b) Les protéines sécrétées | p 27 |
| - Molécules de rhoptries | p 27 |
| - Molécules de Micronèmes | p 28 |
| - Molécules de granules denses | p 28 |
| c) Molécules spécifiques de stades parasitaires | p 30 |
| d) Autres molécules | p 31 |
| D) La toxoplasmose | p 32 |
| 1) La toxoplasmose acquise | p 32 |
| a) Chez les sujets immunocompétents | p 32 |
| - Formes apparentes | p 32 |
| - Formes inapparentes | p 33 |
| b) Chez les sujets immunodéprimés | p 33 |
| 2) La toxoplasmose congénitale | p 34 |
| a) Chez l'homme | p 34 |
| b) Chez le mouton | p 35 |

| | |
|--|-------------|
| II) POUVOIR PATHOGENE, MECANISMES DE DEFENSE ET MODELES EXPERIMENTAUX D'ETUDE | p 36 |
| A) Souches et virulences | p 36 |
| 1) Variation antigénique des souches | p 36 |
| 2) Variation enzymatique des souches | p 37 |
| 3) Polymorphisme génétique | p 37 |
| B) Mécanismes de défense chez l'homme et les rongeurs | p 40 |
| 1) Toxoplasme et immunité non spécifique | p 40 |
| a) Les barrières générales | p 40 |
| b) Les barrières chimiques : les cytokines | p 41 |
| - Les interférons | p 41 |
| - Le TNF- α (Tumor Necrosis Factor α) | p 42 |
| - Les interleukines | p 43 |
| c) Les barrières cellulaires | p 44 |
| - Les cellules phagocytaires : macrophages et neutrophiles | p 44 |
| - Les cellules NK (Natural Killer) | p 46 |
| 2) Toxoplasme et immunité spécifique à médiation cellulaire | p 46 |
| a) Rôle des lymphocytes T | p 48 |
| b) Les plaquettes | p 50 |
| C) Contribution des modèles animaux | p 50 |
| Les principaux modèles animaux de toxoplasmose | p 51 |
| 1) Modèles animaux de toxoplasmose acquise | p 51 |
| 2) Modèles animaux de toxoplasmose cérébrale | p 54 |
| 3) Modèles animaux de toxoplasmose oculaire | p 55 |
| 4) Modèles animaux et toxoplasmose congénitale | p 55 |
| 5) Modèles animaux d'immunosuppression et réactivation toxoplasmique | p 56 |
| III) METHODES DE DETECTION DE L'INFECTION ET TRAITEMENT DE LA TOXOPLASMOSE | p 58 |
| A) Méthodes de détection de l'infection | p 58 |
| 1) Diagnostic sérologique | p 59 |
| a) Quelques rappels de l'immunité humorale humaine | p 59 |
| b) Description des techniques sérologiques | p 60 |
| - Le Dye-test ou test de lyse de Sabin et Feldman | p 60 |
| - L'immunofluorescence indirecte (IFI) | p 61 |
| - L'agglutination directe | p 61 |
| - L'agglutination directe sensibilisée (ADS) | p 61 |
| - La réaction d'agglutination indirecte | p 61 |
| - Les réactions immunoenzymatiques indirectes (ELISA) | p 62 |

| | |
|--|-------------|
| - L'immunofiltration (ELIFA) | p 62 |
| - Le test de Remington | p 62 |
| - Les réactions immunoenzymatiques par technique reverse | p 62 |
| - L'adsorption reverse (ISAgA) | p 63 |
| 2) Diagnostic direct du parasite | p 64 |
| a) L'inoculation à la souris | p 64 |
| b) La culture cellulaire | p 64 |
| c) La détection par amplification génique (PCR) | p 65 |
| - Principe de la PCR | p 65 |
| - Détection du toxoplasme par PCR | p 67 |
| - Utilisation de la PCR pour quantifier le degré d'infection | p 69 |
| a) Données actuelles de la PCR quantitative sur ADN | p 70 |
| - Les différentes stratégies de construction d'une molécule standard | p 70 |
| - Les différents modèles de quantification | p 72 |
| b) Les applications médicales de la quantification par PCR | p 75 |
| 3) Signes radiologiques | p 76 |
| 4) Les signes biologiques non spécifiques | p 77 |
| B) Traitement de la toxoplasmose | p 77 |
| 1) Traitement de la toxoplasmose congénitale | p 78 |
| 2) Traitement de la toxoplasmose cérébrale | p 79 |
| OBJECTIFS | p 81 |
| MATERIEL ET METHODES | p 83 |
| I) ABBREVIATIONS ET COMPOSITION DES TAMPONS ET MILIEUX DE CULTURE | P 84 |
| A) Solutions et tampons | p 84 |
| B) Milieux de culture | p 85 |
| II) PREPARATION DES OLIGONUCLEOTIDES | p 86 |
| A) Séquences et nomenclature des oligonucléotides | p 86 |
| 1) Pour la construction d'une molécule étalon polyspécifique | P 86 |
| 2) Gène B1 | p 86 |
| 3) Gène ARNr | p 86 |
| 4) Gène <i>SAG1</i> | p 87 |
| 5) Gène <i>GRA2</i> | p 87 |
| 6) Gène β tubuline | p 87 |
| 7) Oligonucléotides consensus / gène ARNr 5S | p 87 |

| | |
|--|------|
| 8) Oligonucléotides consensus / gène Histone H4 | p 87 |
| B) Synthèse d'oligonucléotides | p 88 |
| C) Purification d'oligonucléotides | p 88 |
| III) CULTURES | p 89 |
| A) Cultures cellulaires | p 89 |
| 1) Décongélation d'une lignée lymphocytaire humaine | p 89 |
| 2) Culture de cellules lymphocytaires | p 89 |
| 3) Cryoconservation de cette lignée cellulaire | p 89 |
| B) Cultures bactériennes | p 89 |
| 1) Conservation des souches en glycérol | p 89 |
| 2) Ensemencement | p 90 |
| IV) PREPARATIONS D'ADN GENOMIQUE | p 90 |
| A) Préparation d'ADN génomique de <i>Toxoplasma gondii</i> | p 90 |
| 1) Préparation d'ADN de tachyzoïtes sur double gradient de Chlorure de Césium | p 90 |
| 2) Préparation d'ADN génomique à partir de tachyzoïtes isolés un à un | p 91 |
| 3) Préparation d'ADN génomique de tachyzoïtes issus de liquide amniotique de rates | p 91 |
| 4) Témoin positif pour la PCR | p 91 |
| 5) Préparation d'ADN génomique à partir des parasites (kystes) | p 92 |
| B) ADN génomique humain | p 92 |
| C) ADN génomique de souris | p 92 |
| V) PREPARATION D'ACIDE NUCLEIQUE TOTAUX (ANt) | p 93 |
| Préparation d'ANt de tachyzoïtes | p 93 |
| VI) PREPARATION D'ARN : RNAzol B | p 93 |
| A) Préparation d'ARN de tachyzoïtes | p 93 |
| B) Préparation d'ARN de bradyzoïtes | p 94 |
| VII) PREPARATION D'ADN PLASMIDIQUE | p 94 |
| A) Maxiproduction de plasmide recombinant | p 94 |
| B) Purification de plasmide sur gradient de Chlorure de Césium | p 95 |
| C) Préparation d'ADN monobrin (séquençage) | p 95 |
| 1) M13mp 18 | p 95 |
| 2) pBluescript | p 95 |
| 3) pBluescript et "TA cloning" | p 96 |
| D) Production et dénaturation d'ADN plasmidique double brin (séquençage) | p 97 |

| | |
|---|--------------|
| VIII) AMPLIFICATION DE SEQUENCES NUCLEOTIDIQUES SPECIFIQUES | P 97 |
| IX) REVERSE TRANSCRIPTION / POLYMERASE CHAIN REACTION (RT/PCR) | p 98 |
| X) PURIFICATION SUR GEL D'AGAROSE DE FRAMENTS D'ADN | p 98 |
| A) Fragments inférieurs à 1500 pb | p 98 |
| B) Fragments supérieurs à 1500 pb | p 99 |
| XI) CLONAGE DES FRAGMENTS PCR. | p 99 |
| A) Clonage d'un fragment PCR aux extrémités bouts francs | p 99 |
| 1) Traitement à la Klenow | p 99 |
| 2) Traitement à la T4 polynucléotide kinase | p 100 |
| B) Clonage d'un fragment PCR dans le vecteur "TA Cloning" | p 100 |
| Principe du clonage | p 100 |
| C) Ligation | p 100 |
| 1) Dans M13mp 18 coupé par Hind III | p 100 |
| 2) Dans le vecteur "TA Cloning" | p 101 |
| D) Sous-clonage dans pUC 18 | p 101 |
| XII) TRANSFORMATIONS BACTERIENNES | P 101 |
| A) Transformation par électroporation | p 101 |
| 1) Préparation de bactéries compétentes | p 101 |
| a) Bactéries compétentes fraîchement préparées | p 101 |
| b) Bactéries compétentes conservées à -80°C | p 102 |
| 2) Microdialyse de l'ADN plasmidique recombinant | p 102 |
| 3) Electroporation | p 102 |
| B) Transformation en "TA Cloning" | p 102 |
| C) Sélection et identification des transformants | p 103 |
| 1) Vecteur M13 | p 103 |
| 2) Vecteur "TA Cloning" | p 103 |
| 3) Vecteur pUC 18. | p 104 |
| XIII) SEQUENÇAGE | p 104 |
| A) Séquençage | p 104 |
| 1) Séquençage manuel | p 104 |
| 2) Séquençage automatique | p 105 |
| B) Analyse des séquences | p 105 |
| XIV TRANSFERT D'ADN SUR FILTRE DE NYLON | p 105 |
| A) Southern Blot | p 105 |
| B) Dot Blot | p 106 |
| XV) PREPARATION DES SONDÉS NUCLEIQUES | p 106 |
| A) Marquage de sondes oligonucléotides par le ³² P | p 106 |

| | |
|---|--------------|
| B) Marquage de sonde ADN double brin par le ³² P | p 106 |
| XVI) SYSTEMES DE REVELATION D'ACIDES NUCLEIQUES MARQUES | p 107 |
| A) Révélation par chimioluminescence | p 107 |
| B) Hybridation à l'aide d'une sonde nucléotidique ³² P | p 107 |
| 1) Sonde oligonucléotide 5' ³² P | p 107 |
| 2) Sonde ADN double brin ³² P | p 108 |
| C) Déhybridation d'une membrane de nylon | p 108 |
| XVII) CONSTRUCTION DE MOLECULES ETALON (PCR QUANTITATIVE) | p 108 |
| A) Construction d'une molécule étalon polyspécifique (PCR quantitative sur ADN) | p 108 |
| B) Construction d'une molécule étalon (PCR quantitative sur ARN) | p 109 |
| XVIII) PCR QUANTITATIVE SUR ADN | p 110 |
| A) Constitution d'une gamme étalon | p 110 |
| B) Conditions préalables d'amplification dans ce système de PCR quantitative | p 110 |
| XIX) COLORATION DE KYSTES | p 111 |
| RESULTATS | p 112 |
| I) DIAGNOSTIC DE LA TOXOPLASMOSE PAR BIOLOGIE MOLECULAIRE : INTERET DE LA TECHNIQUE "PCR " | p 113 |
| A) Recherche de séquences génomiques répétées spécifiques de l'espèce <i>Toxoplasma gondii</i> | p 113 |
| 1) Séquences d'ADN répétées en tandem | p 113 |
| 2) Clonage de gènes connus pour être hautement répétés (histone H4 et ARNr 5S) | p 114 |
| a) Gène histone H4 | p 116 |
| - Amplification de l'ADN génomique | p 116 |
| - Identification des produits PCR sur l'ensemble des espèces par hybridation avec une sonde consensus du gène histone H4 (S H4) | p 120 |
| - Clonage du gène Histone H4 de <i>Plasmodium falciparum</i> | p 123 |
| b) Gène ARNr 5S | p 127 |
| 3) Gène B1 et augmentation du nombre de cibles d'amplification | p 131 |
| B) Mise au point d'un diagnostic de la toxoplasmosse par amplification génique associée à un système de révélation par chimioluminescence | p 136 |

| | |
|---|-----------|
| 1) Mise au point technique | p 138 |
| 2) Recherche de toxoplasmes dans le liquide amniotique | p 146 |
| II) QUANTIFICATION DE LA CHARGE PARASITAIRE INTRATISSULAIRE | p 153 |
| III) ANALYSE PAR PCR DE L'EXPRESSION GENIQUE CHEZ <i>TOXOPLASMA GONDII</i> | p 186 |
| A) Etude du gène <i>SAG3</i> : | P 186 |
| B) Etude de la corrélation entre "virulence et expression génique" par PCR quantitative sur ARN | p 188 |
| DISCUSSION | p 204 |
| DIAGNOSTIC DE LA TOXOPLASMOSE PAR AMPLIFICATION GENIQUE | p 205 |
| Elaboration d'un test diagnostique de toxoplasmose par PCR | p 205 |
| Avantages du diagnostic de toxoplasmose par PCR | p 209 |
| * Comparaison entre PCR et techniques parasitologiques traditionnelles | p 209 |
| * Toxoplasmose et immunodépression | p 210 |
| * Toxoplasmose oculaire | p 212 |
| * Toxoplasmose congénitale | p 213 |
| INTERET DE LA PCR QUANTITATIVE SUR ADN DANS L'ETUDE DE LA TOXOPLASMOSE | p 217 |
| Elaboration d'un modèle de PCR quantitative sur ADN | p 217 |
| Application de la PCR quantitative aux modèles d'étude de la toxoplasmose humaine et expérimentale | p 219 |
| INTERETS DE LA RT-PCR QUANTITATIVE DANS L'ETUDE DU POUVOIR PATHOGENE DU TOXOPLASME | p 222 |
| Elaboration d'un modèle de RT-PCR quantitative | p 222 |
| Approches expérimentales | p 224 |
| CONCLUSION ET PERSPECTIVES | p 226 |
| BIBLIOGRAPHIE | p 231 |

INTRODUCTION

I) GENERALITES

A) Historique et Taxonomie

En 1908, à l'institut Pasteur de Tunis, Charles Nicolle en étroite collaboration avec Louis Manceaux, isole chez un rongeur Nord-africain (*Ctennodactylus gondii*) suspecté d'être impliqué dans la transmission du bouton d'Orient (Leishmaniose cutanée), un parasite très semblable à des Leishmanies (Nicolle et Manceaux, 1908). Ils le dénomèrent tout naturellement *Leishmania gondii* mais décidèrent, suite à leur impossibilité de le cultiver *in vitro* et en référence à sa forme arquée, de créer un nouveau genre, *Toxoplasma gondii*. (du grec Toxon : arc et Plasma : forme) (Nicolle et Manceaux, 1909). La même année au Brésil, Splendore décrit la présence de ce parasite chez un lapin de laboratoire (Splendore, 1909). Il lui avait provisoirement donné le nom de *Toxoplasma cuniculi*.

Bien que ce parasite fut retrouvé dans la rétine d'un enfant hydrocéphalique lors d'une autopsie (Janku, 1923), la transmission intra-utérine et les premiers cas d'encéphalite toxoplasmique néonatale humaine furent décrits par Wolf et Cowen (Wolf et Cowen, 1937 et Wolf *et al.*, 1939a et 1939b). Quelques années plus tard, l'ensemble des aspects cliniques de la toxoplasmose congénitale fut caractérisé (Sabin, 1941 et 1942).

La mise au point du test de lyse dépendante du complément également appelé "Dye Test" (Sabin et Feldman, 1948), permit d'établir la large répartition de *Toxoplasma gondii* à travers le monde.

En 1960, Jacobs et ses collaborateurs démontrèrent la résistance à la digestion protéolytique de la forme enkystée du parasite (Jacobs *et al.*, 1960). Cinq ans plus tard, Desmonts (Desmonts *et al.*, 1965) suggéra alors que la viande contaminée et consommée crue ou saignante pouvait être la source d'infection la plus importante. Cependant, l'infestation des herbivores et des oiseaux restait énigmatique. En 1969, Frenkel affirme que les toxoplasmes sont transmis par les oeufs d'un ascaris du chat, *Toxocara cati*. (Frenkel *et al.*, 1969). Ces résultats seront ensuite ébranlés grâce à l'isolement du parasite dans des selles de chats non porteurs d'ascaris (Sheffield et Melton, 1969). C'est également en 1969 que Work et Hutchisson (Work et Hutchisson, 1969) découvrirent, dans les selles d'un chat infesté par *Toxoplasma gondii*, une forme infectieuse pour la souris et résistante dans le milieu extérieur.

Finalement, en 1970, la totalité du cycle du parasite fut élucidée. Différents auteurs (Frenkel *et al.*, 1970; Hutchison *et al.*, 1970 et Sheffield et Melton, 1970) confirmèrent l'existence d'une phase sexuée au cours du cycle parasitaire chez les félinés et démontrèrent que les toxoplasmes étaient effectivement des coccidies de chat chez lequel ils avaient la possibilité d'évoluer suivant un cycle complet, mais qu'ils possédaient également un cycle incomplet chez les hôtes intermédiaires.

Actuellement et selon la classification de Levine (Levine *et al.*, 1980), *Toxoplasma gondii* appartient au Phylum *Apicomplexa*, à la classe *Sporozoea*, à la sous-classe *Coccidia*, à l'ordre *Eucoccidiida*, au sous-ordre *Eimeriina*, à la famille *Eimeriidae*, au genre *Toxoplasma*. (Figure 1)

B) *Toxoplasma gondii* : morphologies et cycle

Au cours du cycle parasitaire, le toxoplasme se présente sous différentes formes dont trois stades sont infectieux : tachyzoïte, bradyzoïte et sporozoïte.

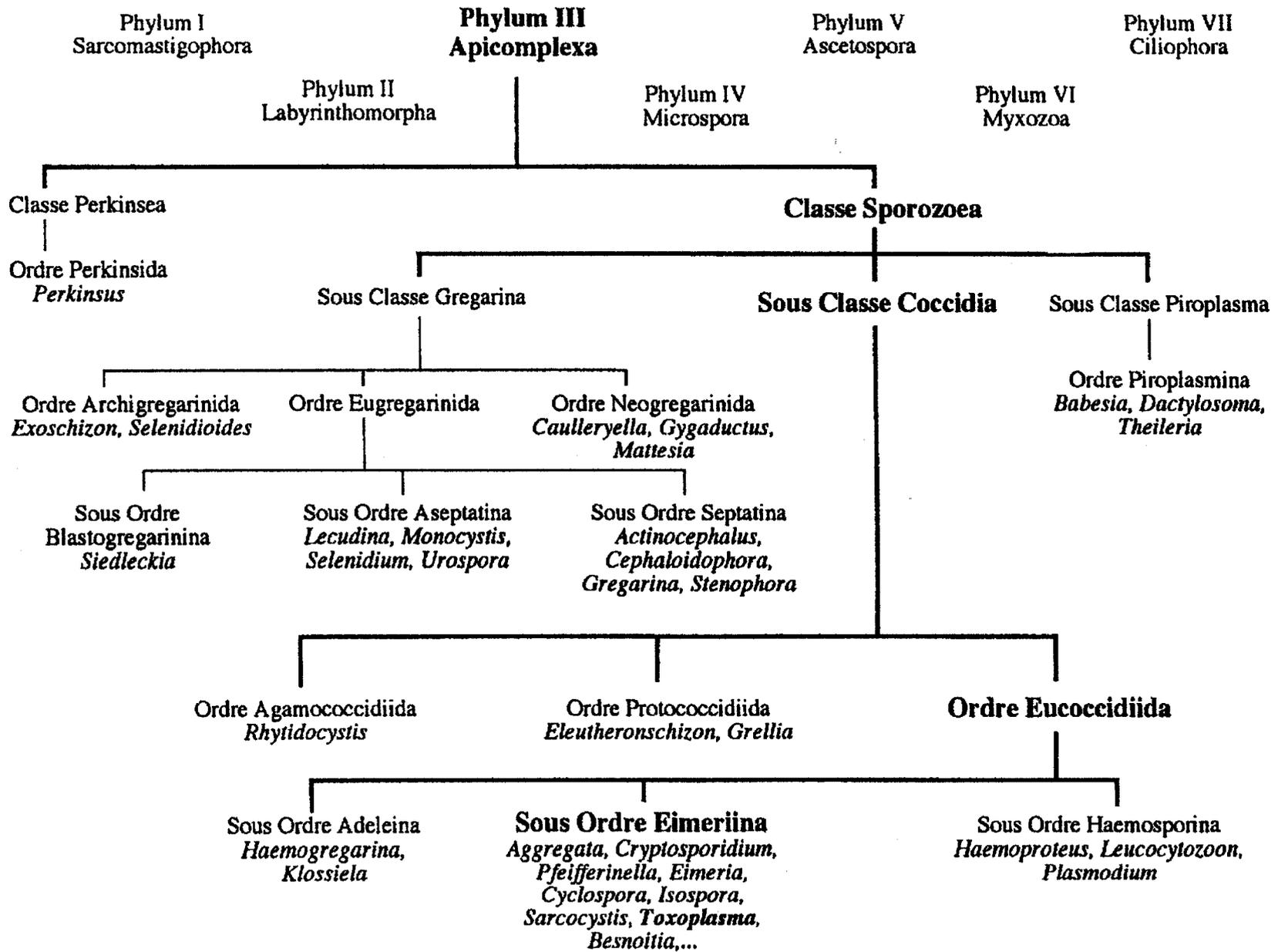
1) Morphologie des différents stades infectieux du parasite

a) Tachyzoïte

Le tachyzoïte (du grec tachos : rapide) anciennement appelé trophozoïte (du grec trophicos : se nourrir) ou endozoïte, est une forme proliférative intracellulaire observée pendant la phase aiguë de l'infection. Sa multiplication rapide par endodyogenèse s'opère dans toutes les cellules de l'hôte intermédiaire et dans toutes les cellules non-intestinales de l'hôte définitif.

Le tachyzoïte est un organisme en forme de croissant, de 6 à 7 μm de longueur et d'environ 2 μm de largeur (figure 2). L'extrémité postérieure est plus arrondie que l'extrémité antérieure. Son noyau se situe près du pôle postérieur alors que le pôle antérieur, éffilé, présente un appareil de pénétration complexe, le conoïde. Les rhoptries, organites sécrétoires, se situent au niveau du pôle antérieur et déversent leur contenu par le conoïde, lors de la pénétration du parasite dans la cellule hôte (Nichols *et al.*, 1983). Le complexe apical comprend également des micronèmes et des granules denses. Le micropore situé dans la partie médiane du parasite correspondrait à une région spécialisée du réticulum endoplasmique (De Melo et De Souza, 1997). Le complexe membranaire

FIGURE 1 : Classification des protozoaires (Levine *et al.*, 1980)



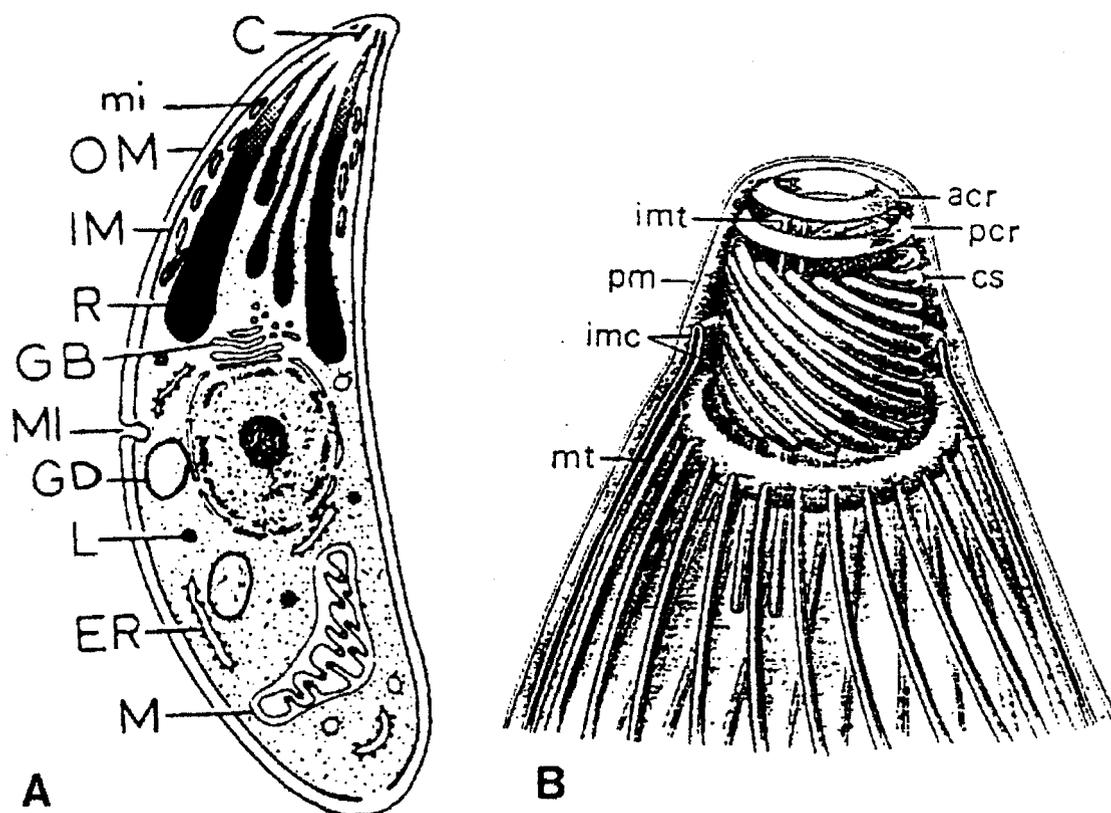


FIGURE 2 :

A) Structure schématique d'un tachyzoïte (Shéma d'après Dubey et Beattie, 1988)

| | | |
|----------------|------------------------|-------------------------------------|
| mi : Micronème | GD : Granule dense | ER : Réticulum endoplasmique |
| C : Conoïde | GB : Appareil de Golgi | IM : Complexe membranaire interne |
| L : Lysosomes | M : Mitochondrie | OM : Plasmalemme (membrane externe) |
| R : Rhoptrie | N : Noyau | |

B) Shéma détaillé de la région antérieure du toxoplasme (Nichols et Chiappino, 1987)

| | |
|--|---|
| imc : Complexe membranaire interne | pm : Membrane plasmique |
| mt : Microtubule | imt : Microtubule interne |
| arc : Ceinture préconoïdale antérieure | pcr : Ceinture préconoïdale postérieure |
| cs : Unité de conoïde | |

est composé d'une membrane externe (plasmalemme) et d'un complexe membranaire interne double très fluide (Gallois *et al.*, 1988), formé de vésicules aplaties (Vivier et Petiprez, 1969 et Porchet-Henneré et Torpier, 1983) en dessous duquel un réseau de 22 microtubules organise le cytosquelette du parasite (Nichols et Chiappino, 1987). Le plasmalemme est recouvert d'une couche de glycoprotéines appelée "cell-coat" (Rabjeau *et al.*, 1997). Le tachyzoïte comporte un appareil de Golgi, une mitochondrie unique et ramifiée et du réticulum endoplasmique.

b) Bradyzoïte, forme d'enkystement

Le bradyzoïte (du grec brady : lent) parfois appelé cystozoïte, est une forme enkystée à multiplication lente, spécifique de la phase chronique de l'infection. Les bradyzoïtes ont une morphologie peu différente des tachyzoïtes mais contiennent par contre un grand nombre de granules cytoplasmiques de nature polysaccharidique.

Au cours de la phase aigüe de la toxoplasmose, les toxoplasmes vont s'enkyster dans les muscles, le cerveau, le coeur et la rétine où ils persistent pendant toute la vie de l'hôte (Remington et Cavanaugh, 1965). Les facteurs responsables de la formation des kystes ne sont pas entièrement élucidés, cependant ils sont favorisés par des réponses anticorps élevées mais également par l'implication de l'immunité à médiation cellulaire (Brinkmann *et al.*, 1987).

La paroi du kyste se forme à partir de la membrane de la vacuole parasitophore (Ferguson *et al.*, 1987a). Elle possède au niveau de sa couche neurofibrillaire des composants de la cellule hôte (Sims *et al.*, 1988). Les kystes de forme sphérique ou ovoïde, dont le diamètre peut atteindre 100 μm , peuvent contenir plusieurs milliers de bradyzoïtes. Les kystes sont des éléments intracellulaires, pourtant chez des souris SWISS inoculées par la souche Me49 de *Toxoplasma gondii*, seuls des kystes extracellulaires ont été observés. Ils présentaient à l'intérieur, des bradyzoïtes à différents stades de maturation (Pavesio *et al.*, 1992). Détectables dès le 8^{ème} jour après infection chez l'animal (Lainson, 1958), les kystes sont résistants à des température de 45°C et ne sont détruits que par des congélations prolongées. Les bradyzoïtes sont plus résistants aux sucs digestifs que les tachyzoïtes bien que la paroi du kyste soit détruite immédiatement après ingestion (Jacobs *et coll.*, 1960).

Dans des conditions physiologiques, la libération de faibles quantités d'antigènes par fuite à travers la paroi (Huldt, 1971) ainsi que la rupture accidentelle de la paroi du kyste (Frenkel, 1973) seraient à l'origine d'un stimulus antigénique répété permettant

ainsi le maintien de l'immunité protectrice totale et définitive existant dans la toxoplasmose (Remington et Krahenbuhl, 1982). La rupture de kystes peut se produire occasionnellement *in vivo* chez un hôte immunocompétent tout en étant asymptomatique (Ferguson *et al.*, 1989). Par contre, chez des sujets immunodéprimés, cette rupture peut être responsable d'encéphalite et de chorioretinite (Frenkel, 1988).

c) Sporozoïte et oocyste (Figure 3)

L'oocyste, autre forme de résistance du parasite, correspond au zygote issu de la phase sexuée du cycle de développement du parasite (chez le chat). De géométrie elliptique, les oocystes mesurent environ 9 et 14 μm selon leurs deux axes. L'oocyste non sporulé contient un sporonte (masse remplissant l'oocyste). Lors de la sporulation, le sporonte se divise en deux corps sphériques appelés sporoblastes qui secondairement s'allongent pour former les sporocystes. Chaque sporocyste sera à l'origine de quatre sporozoïtes. Les sporozoïtes (6 à 8 μm de longueur) sont morphologiquement peu différents des tachyzoïtes. Cependant, ils possèdent une plus grande richesse en micronèmes et en rhoptries (Sheffield et Melton, 1970).

Entourés d'une double paroi, les oocystes sont extrêmement résistants à de nombreux agents chimiques (Kuticic et Wikerhauser, 1996). Ils demeurent infestants plus d'un an en atmosphère humide et résistent plusieurs mois à des températures glaciales.

2) Le cycle parasitaire

Le cycle naturel du toxoplasme est caractérisé par deux phases : la phase asexuée (cycle incomplet) et la phase sexuée (cycle complet), produisant chacune un stade infestant particulier (Figure 4).

a) Cycle de multiplication asexuée

Il se déroule chez l'hôte intermédiaire (homme, mammifères homéothermes omnivores ou carnivores et oiseaux) mais peut également se produire chez l'hôte définitif.

La contamination s'effectue le plus souvent par voie digestive lors de l'ingestion de kystes contenus dans de la viande parasitée ou d'oocystes présents dans les aliments telluriques souillés par les fèces du chat.

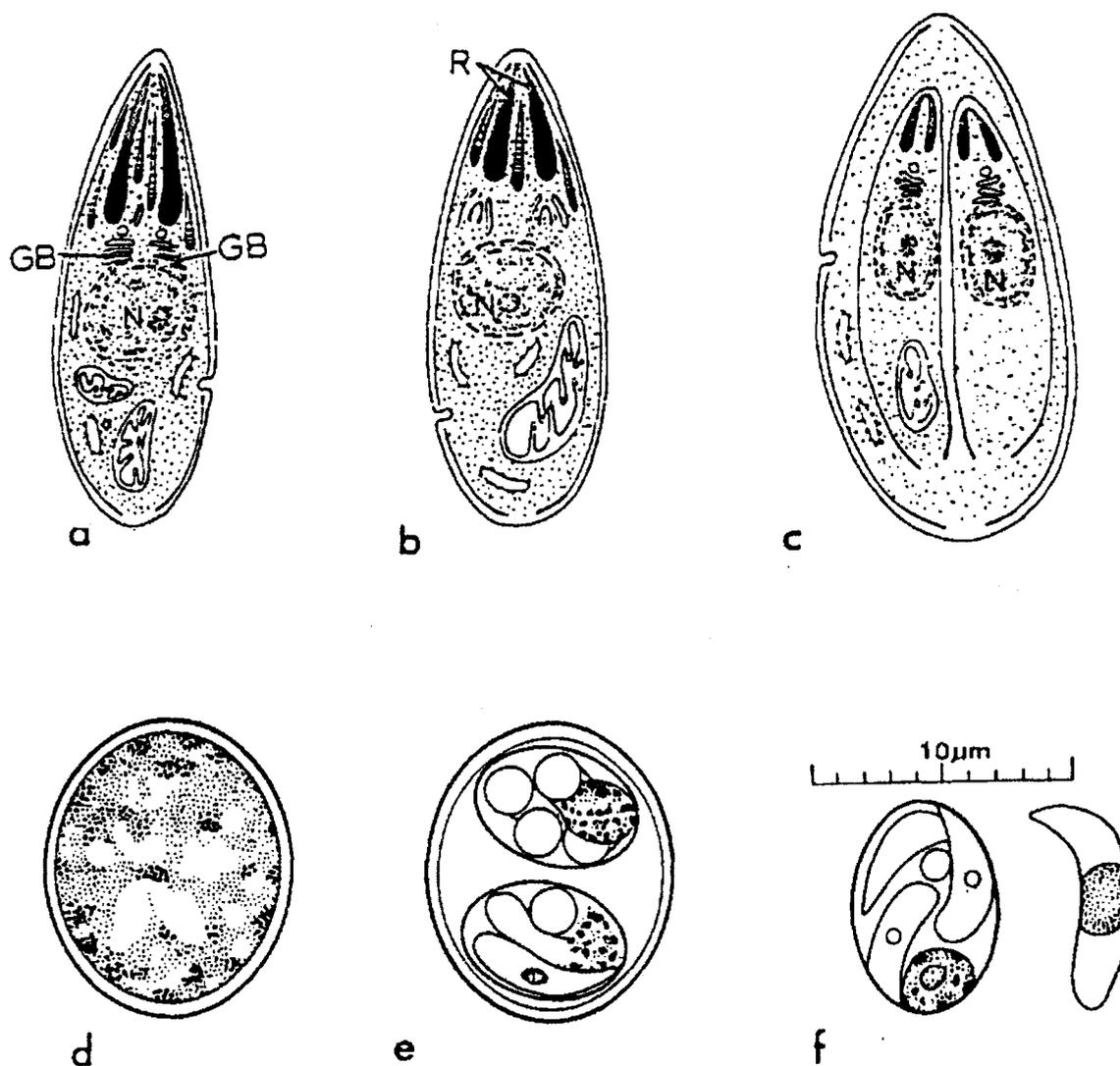


FIGURE 3 : Endodyogénèse. Shémas d'oocystes, de sporocyste et de sporozoïte.
(Bubey et Beattie, 1988)

GB : Appareil de Golgi

R : Rhoptrie

a, b, c : Différents stades de la division d'un tachyzoïte par endodyogénie

d : Oocyste non sporulé

e : Oocyste sporulé avec 2 sporocystes contenant des sporozoïtes

f : Sporocyste avec des sporozoïtes et une masse résiduelle

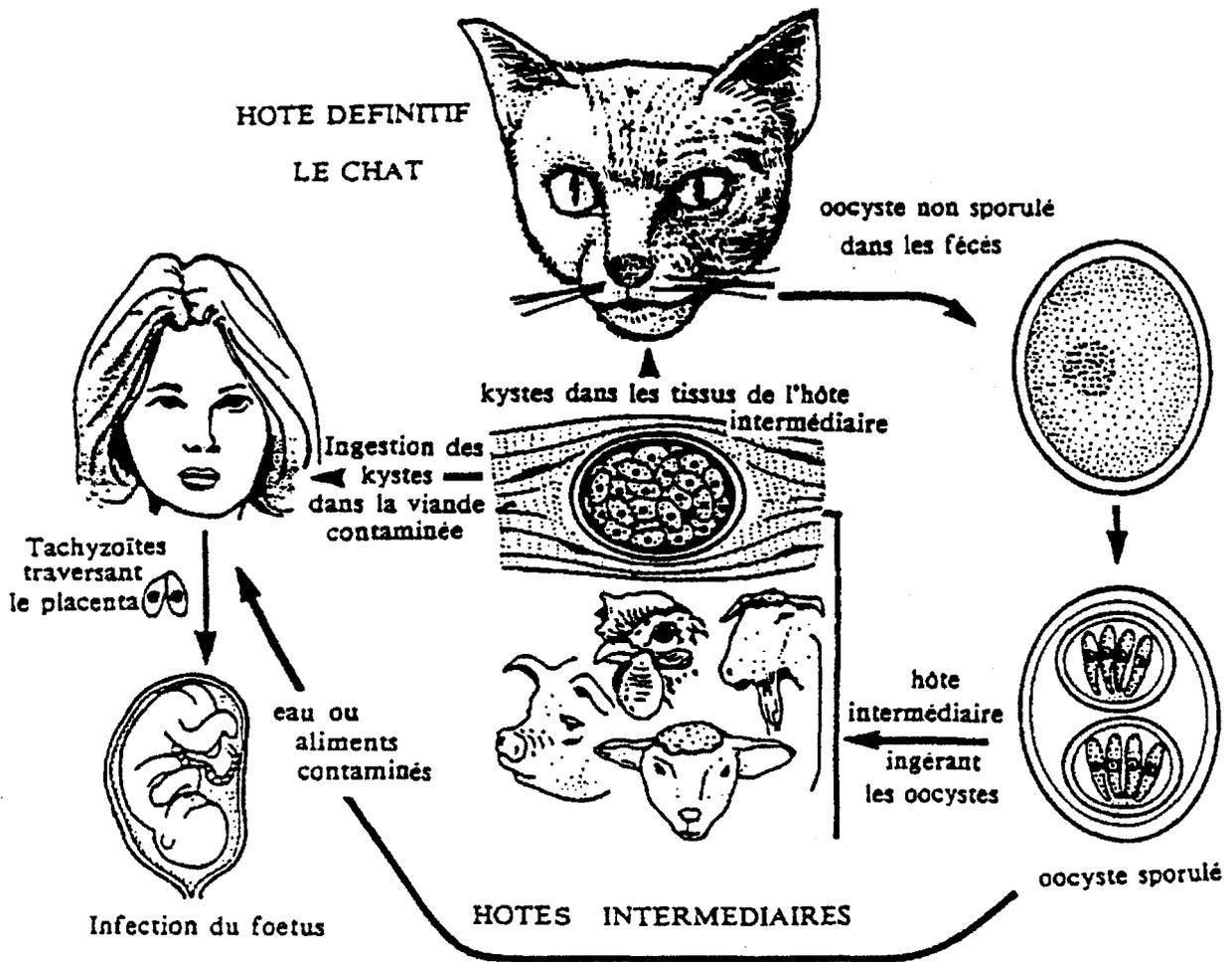


FIGURE 4 : Cycle évolutif de *Toxoplasma Gondii* (d'après Dubey et Beattie, 1988)

Après digestion, les kystes ou les oocystes libèrent au niveau de l'intestin des bradyzoïtes ou des sporozoïtes qui pénètrent dans les cellules du système réticulo-endothélial. Après leur transformation en tachyzoïtes, les toxoplasmes se multiplient rapidement par endodyogénèse (Figure 3) permettant alors une diffusion parasitaire hématogène dans l'ensemble de l'organisme. L'apparition de la réponse immunitaire chez les sujets immunocompétents va provoquer une diminution de la parasitémie suivie de la formation de kystes intra-cellulaires. Ces kystes permettront la continuation du cycle asexué via le chaînon alimentaire.

Chez la souris, après inoculation de tachyzoïtes, bradyzoïtes ou de sporozoïtes, les kystes sont observés rapidement en moins de 10 jours (Dubey et Frenkel, 1976).

La toxoplasmose congénitale est une conséquence d'un autre mode de contamination : le passage transplacentaire des toxoplasmes de la mère au fœtus.

b) Cycle de reproduction sexuée

Il se déroule chez l'hôte définitif, un féliné (le chat principalement). Ce dernier se contamine en ingérant des kystes contenus dans sa proie (rongeur de petite taille, oiseaux, ...) ou à partir d'oocystes mûrs souillant la terre ou les végétaux.

Les formes végétatives libérées (bradyzoïtes ou sporozoïtes) pénètrent dans les cellules épithéliales de l'intestin grêle du chat (jéjunum) et donnent naissance à plusieurs générations schizogoniques produisant des mérozoïtes (multiplication asexuée appelée schizogonie). Ces mérozoïtes se développent ensuite en gamontes (éléments sexués), eux-même générant deux types de gamètes : les gamètes mâles ou femelles appelés respectivement micro et macrogamétocytes. Toujours au niveau des entérocytes, la fécondation (gamogonie) aboutit à la formation d'un oeuf, l'oocyste qui sera secondairement rejeté dans le milieu extérieur avec les fèces du chat.

Au départ, cet oocyste n'est pas infestant et plusieurs jours sont indispensables pour permettre sa maturation (sporogonie). La sporulation s'effectue en fonction des conditions d'oxygénation et de température du milieu extérieur environnant. Elle produit 8 sporozoïtes infestants par oocyte formé. L'oocyte permet de mieux comprendre l'origine de la contamination des herbivores par ingestion de végétaux souillés. Il est également impliqué dans celle des omnivores mais de façon beaucoup moins prononcée.

C) Edifices moléculaires du toxoplasme

Actuellement, les études moléculaires réalisées sur le toxoplasme ont permis un début de caractérisation du génome mais aussi d'identifier environ une trentaine de protéines dont une partie possède des propriétés immunogènes.

1) Organisation du génome

a) L'ADN

Au cours de son cycle naturel, le toxoplasme est majoritairement haploïde. Par contre, le stade diploïde (l'oocyste) se rencontre uniquement au cours de la phase de reproduction sexuée du parasite. Ne pouvant être cultivé qu'en présence de cellules, généralement de souris, l'étude du génome du toxoplasme n'a pu être réalisée qu'après la mise au point d'un protocole permettant l'élimination de l'ADN murin contaminant. Ainsi, grâce à la richesse en GC (environ 50%) de son ADN, supérieure à celle de la souris (42%) (Johnson *et al.*, 1986a), et grâce à l'utilisation d'un colorant fluorescent s'intercalant au niveau des GC, la séparation sur gradient de CICs de ces deux types d'ADN fut réalisée. La densité de son génome a été évaluée à 1,712 g/cm³ (Neimark et Blaker, 1967).

Le génome est constitué d'au moins 11 chromosomes (Sibley et Boothroyd, 1992a) bien que 9 seulement aient été séparés physiquement par électrophorèse en champ pulsé (Candolfi *et al.*, 1988). Les 10 plus petits ont une taille comprise entre 2 et 10 Mpb. En tenant compte de la taille du génome d'un tachyzoïte estimée par cytofluorométrie à 164 10⁻¹⁵ g (Cornelissen *et al.*, 1984) soit 8 10⁷ pb (Sibley *et al.*, 1993), le 11^{ème} peut être évalué à 40 Mpb. Leur taille reste stable au sein d'une population clonale d'une même souche, tout en présentant un polymorphisme faible entre des souches différentes (Sibley *et al.*, 1993). L'hybridation de différentes sondes sur ces chromosomes (Sibley et Boothroyd, 1992a) ou sur de l'ADN génomique préalablement digéré par des enzymes de restriction (Cristina *et al.*, 1991a et Boothroyd et Sibley, 1993) ont permis d'établir l'ébauche d'une carte génétique (Figure 5). L'exploitation des séquences Tag ("Expressed Sequence Tag", EST) (Wan *et al.*, 1996 et Ajioka *et al.*, 1998) a déjà permis d'identifier plus de 7000 séquences de *Toxoplasma gondii* (plus de 500 séquences ont été associées à une fonction possible) (Ajioka *et al.*, 1998).

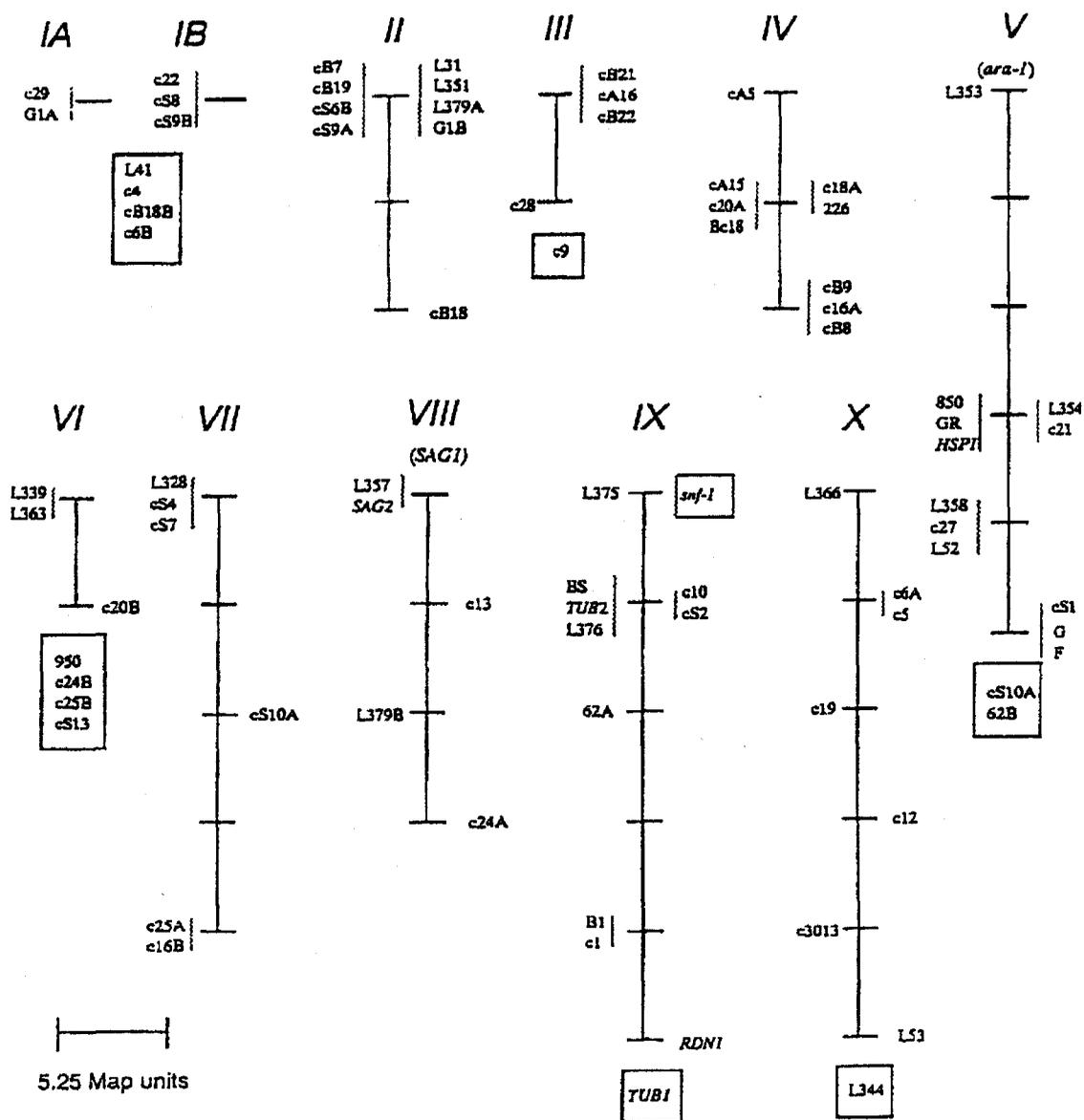


FIGURE 5 : Carte génétique des différents chromosomes de *Toxoplasma gondii* (Sibley, Pfefferkorn et Boothroyd, 1993)

Un ADN circulaire extranucléaire de 36 kb (Borst *et al.*, 1984 et Wilson et Williamson, 1997) de même qu'un ADN extrachromosomique de taille plus petite présentant une homologie avec une séquence d'ADN de *Plasmodium gallinaceum* (Joseph *et al.*, 1989), ont été identifiés. De plus, une partie de l'ADN extrachromosomique circulaire code pour l'ARNr de la petite sous-unité du ribosome mitochondrial (Egea et Lang-Unnasch, 1995).

Des séquences répétées et homologues à certains gènes mitochondriaux (cytochrome oxydase et apocytochrome b) font partie intégrante de l'ADN génomique (Ossorio *et al.*, 1991).

D'autres séquences répétées d'ADN génomique sont actuellement caractérisées (gène B1, TGR1E, gène ARNr,...) (Burg *et al.*, 1989; Cristina *et al.*, 1991b et Cazenave *et al.*, 1990)

b) Nomenclature officielle des gènes clonés (Sibley *et al.*, 1991)

Les gènes codant pour les antigènes de surface sont appelés *SAG*. Les appellations *GRA*, *ROP*, et *MIC* correspondent respectivement aux gènes codant pour des molécules des granules denses, des rhoptries et des micronèmes. A titre d'exemple, la liste suivante présente quelques gènes clonés associés à leur produit : les antigènes de surface P30 (gène *SAG1*) (Burg *et al.*, 1988), P22 (*SAG2*) (Prince *et al.*, 1990), GP43 (*SAG3*) (Cesbron-delaunay *et al.*, 1994); les molécules de rhoptrie ROP1 (Ossorio *et al.*, 1992) et P54 (*ROP2*) (Saavedra *et al.*, 1991), des granules denses P23 (*GRA1*) (Cesbron-Delaunay *et al.*, 1989), GP28,5 (*GRA2*) (Parmley *et al.*, 1993 et Mercier *et al.*, 1993), *GRA3* (Achbarou *et al.*, 1991a), *GRA4* (Mévelec *et al.*, 1992), P21 (*GRA5*) (Lecordier *et al.*, 1993) et P32 (*GRA6*) (Lecordier *et al.*, 1995); l' α et la β tubuline (*TUB1* et *TUB2*) (Nagel et Boothroyd, 1988), l'actine (*ACT1*) (Dobrowsky, 1997), la Dihydrofolate réductase/Thymidylate synthase (*DTS1*) (Ross, 1993), la Nucléotide triphosphate hydrolase (*NTP1*) (Johnson *et al.*, 1989) et les ARN ribosomiques 18S (*RDN1*) (Johnson *et al.*, 1987a et Gagnon *et al.*, 1993) et 5S (*RDN2*) (Guay *et al.*, 1992).

Les fragments génétiques *GRA4* et *ROP2* ont été clonés sur la simple base de l'antigénicité de leur protéine recombinante vis-à-vis de sérums (Johnson et Illana, 1991) ou de clones T humains (Saavedra *et al.*, 1991)

Les dinucléotides AT, TA et GG sont faiblement représentés dans l'espèce *Toxoplasma gondii*, (Johnson, 1990). La troisième base des codons de certains gènes (*SAG1*, et *NTPase*) est souvent représentée par une guanine ou une cytosine.

c) l'ARN

En présence de sérum, et dans un milieu acellulaire, les toxoplasmes sont capables durant une courte période d'assurer une transcription de leurs ARN totaux (Remington *et al.*, 1970). L'un des enzymes impliqués, l'uridine phosphorylase (Pfefferkorn et Pfefferkorn, 1977), quantitativement cent fois plus importante que chez la cellule-hôte, permet ainsi une incorporation spécifique de l'uridine dans les acides nucléiques parasitaires.

Certains des gènes sont des gènes morcelés (*TUB1*, *TUB2*, *DTS1* et *GRA2*) (Nagel et Boothroyd, 1988, Roos, 1993, Parmley *et al.*, 1993) et les sites donneurs et accepteurs de leurs introns respectent le consensus habituel GU/AG (Mercier *et al.*, 1993). De même, l'épissage des introns lors de la maturation des transcrits primaires peut être réalisé à partir d'un extrait nucléaire de cellules Hela (Nagel et Boothroyd, 1988). Dans un modèle de traduction *in vitro*, des ARN polyA⁺ extraits de souche RH, ont été mis en évidence (Prince *et al.*, 1985; Johnson et Illana, 1991). La traduction *in vitro* a également été effectuée en utilisant des lysats de réticulocytes de lapin (Johnson *et al.*, 1986b).

Ces résultats indiqueraient que les signaux gouvernant la traduction sont comparables à ceux des cellules eucaryotes supérieures.

La comparaison des ARNr 18S (Johnson et Baverstock, 1989) a été primordiale pour la classification phylogénétique des Protistes, mais elle a également permis de montrer la diversité évolutive des eucaryotes unicellulaires (Schlegel, 1991). L'ARNr 16S est quant à lui utilisé pour la phylogénèse des procaryotes (Fox *et al.*, 1980). L'analyse de la séquence partielle de l'ARNr 18S de *Toxoplasma gondii* a permis de conclure à l'appartenance de *Toxoplasma* au même groupe monophylogénique que *Plasmodium*. Cependant, et en tenant compte uniquement de 526 sites semi-conservés, la même étude a suggéré un plus grand éloignement phylogénétique entre ces deux espèces (Johnson *et al.*, 1987a). En utilisant la séquence complète de cet ARNr 18S, une autre étude (Gagnon *et al.*, 1993) a corroboré l'éloignement phylogénétique entre *Toxoplasme gondii* et l'espèce *Plasmodium* mais, par contre, elle a établi que *Toxoplasma gondii* et *Sarcocystis muris* appartenaient à un même groupe monophylogénique. Cependant, le genre *Sarcocystis* a été décrit comme

"paraphylogénique", c'est à dire que les différentes espèces qui le constituent se répartissent sur deux groupes monophylogéniques différents (*Sarcocystis arieticanis*, *Sarcocystis gigantea* et *Sarcocystis tenella* pour le premier ; *Sarcocystis muris*, *Toxoplasma gondii* et *Neospora caninum* pour le deuxième) (Ellis *et al.*, 1995). La comparaison génétique par RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic DNA-PCR), a confirmé que *Neospora caninum* est une espèce parasitaire indépendante (Guo et Johnson, 1995). La comparaison de la séquence du gène de l'ARNr 28S a permis de montrer que le domaine D2 (également appelée région C1/C1') présente des différences significatives entre *Toxoplasma gondii* et *Neospora caninum* (coccidie dont le cycle sexué se passe chez le chien) (Ellis *et al.*, 1998). Cette observation est un argument supplémentaire en faveur des résultats de Guo et Johnson. Pour finir, une étude plus récente fondée sur la comparaison de l'ARNr 18S suggère que le genre *Isospora* est beaucoup plus proche phylogénétiquement de *Toxoplasma* et *Neospora* que du groupe monophylogénique *Sarcocystis*. De même, *Isospora* appartiendrait à la famille *Sarcocystidae* et non plus à la famille *Eimeriidae* (Carreno *et al.*, 1998).

A partir d'ARN totaux, trois bandes majeures de 28S, 18S et 14S (Johnson *et al.*, 1986) ont été révélées par sédimentation. Le poids moléculaire des composants 28 et 18S correspond au poids moléculaire des ARN ribosomiques spécifiques des eucaryotes (Johnson *et al.*, 1986b).

Chez les eucaryotes dont les mammifères et les amphibiens, les gènes codant pour l'ARN des ribosomes sont transcrits sous forme d'un précurseur renfermant les séquences de l'ARN 18S, 28S mais également celle d'un troisième ARNr, l'ARNr 5,8S. L'organisation des gènes 5S se distingue de celle des gènes d'ARNr 18, 5,8 et 28S car ils ne leur sont généralement pas liés. Par contre, pour *Toxoplasma gondii*, ces gènes sont, comme dans le cas de *Saccharomyces cerevisiae* (Guay *et al.*, 1992) et du protozoaire *Euglena gracilis* (Curtis et Rawson, 1981), sur le même locus chromosomique. Plus remarquablement, le gène ARNr 5S de ce parasite est localisé sur l'unité d'ADN ribosomique équivalente au transcript primaire de 7,5 kb (Guay *et al.*, 1992). Cette structure génomique 18S, 26S (au lieu de 28S) et 5S est également comparable à celle du basidiomycète *Coprinus cinereus* (Guay *et al.*, 1992). A partir de la détermination de la taille des ARN ribosomiques en gel polyacrylamide, cette même étude suggère l'existence possible d'un ARN ribosomique 5,8S probablement localisé entre le gène ARNr 18 et 26S. Du fait de son organisation génomique, le nombre de copies de l'ARN 5S est identique à celui de l'ARN 18S soit 110 copies par génome haploïde. Une étude récente a permis de caractériser le gène ARNr 26S mais également celui de l'ARNr 5,8S. En définitif, le transcript primaire de 7,5 kb renferme la séquence des gènes ARNr 18S, 5,8S, 26S et 5S (figure 22) (Cagnon *et al.*, 1996).

2) Fonctions et caractéristiques des produits traductionnels du toxoplasme

Des quelques 1000 protéines de *Toxoplasma gondii* (Pfefferkorn, 1990) mises en évidence par des techniques d'électrophorèse en gel de polyacrylamide, de radiomarquage et d'immunotransfert et provenant de fractions solubles ou insolubles du parasite (Handman *et al.*, 1980a ; Hughes et Balfour, 1981 ; Johnson, 1985 et Bessière *et al.*, 1992), la majorité de ces molécules est décrite comme antigénique et classée comme telle.

a) Les molécules membranaires ou antigènes de surface

Bien qu'il existe selon les auteurs une discordance sur leur poids moléculaire, les quatre antigènes majeurs de surface décrits sont : P30 (SAG1) (Handman *et al.*, 1980a), GP43 (SAG3), (Cesbron-Delauw *et al.*, 1994), P22 (SAG2) (Prince *et al.*, 1990) et P35 (SAG4) (Couvreur *et al.*, 1988a).

Ces molécules sont ancrées dans la membrane plasmique par un groupement glycosylphosphatidylinositol (GPI) (Nagel et Boothroyd, 1989 et Tomavo et coll, 1989). Cette structure d'ancrage probablement clivée par la phospholipase C provoque l'apparition d'un épitope cross-réactif commun à toutes ces molécules (Tomavo *et al.*, 1989). Ce phénomène de disparition des composants membranaires de surface est appelé "shedding" (Dubremetz *et al.*, 1985 et Sibley et Krahenbuhl, 1988). Les études de l'ADNc codant pour la P30 (Burg *et al.*, 1988), la P22 (Prince *et al.*, 1990) et la GP43 (Cesbron-Delauw *et al.*, 1994) ont mis en évidence une séquence signal N-terminal impliquée dans l'exportation hors de la cellule, mais également une séquence hydrophobe C-terminal liée à l'ancrage GPI. Ces molécules subissent des phosphorylations post-traductionnelles sur des résidus sérine mais également au niveau du GPI. Aux rares exceptions comme la GP43 (Darcy *et al.*, 1990), ces protéines ne semblent pas posséder d'autres groupements osidiques à l'exception de leur GPI.

La séquence de la protéine SAG3 présente des homologies avec celle de la protéine SAG1. (Cesbron-Delauw *et al.*, 1994). L'étude de la région située en amont du gène *SAG1* a permis d'identifier un gène codant pour une protéine SRS1 ("SAG1-related sequence 1"). Cette protéine possède des homologies de séquence avec SAG1 et SAG3 et correspond par conséquent à la troisième protéine appartenant à la famille des protéines liées à SAG1 (Hehl *et al.*, 1997).

La protéine SAG2 jouerait un rôle dans la mobilité et l'orientation du parasite après son attachement à la cellule-hôte (Grimwood et Smith, 1996).

Trois mutants affectant l'expression de protéines de surface ont été obtenus. Le premier est un mutant qui n'exprime plus la protéine SAG2 (P22) (Kasper *et al.*, 1982). Le deuxième présente une diminution de l'expression de sa protéine SAG1 (P30) (Kasper, 1987). Pourtant, ces deux mutants sont toujours capables d'envahir les cellules comparées aux souches sauvages. Le troisième obtenu par double recombinaison homologue n'exprime plus la protéine SAG3 (mutant nul *SAG3*⁻) et présente, *in vitro*, une diminution de sa capacité à envahir les cellules et, *in vivo*, une diminution de sa virulence (Tomavo, 1996).

b) Les protéines sécrétées

Au cours de certaines infections parasitaires naturelles ou expérimentales, des molécules très immunogènes possédant souvent des activités enzymatiques variées, sont excrétées ou sécrétées par le parasite. Ces antigènes, qui sont parfois exprimés transitoirement à la surface du toxoplasme, peuvent constituer de bons candidats à l'immunoprophylaxie (Capron et Dessaint, 1988).

- Molécules de rhoptries

Les rhoptries contiennent une quantité importante de molécules (Herion *et al.*, 1993) dont de nombreux polypeptides polycationiques (Werk *et al.*, 1984) riches en acides aminés basiques (lysine, histidine et arginine). Le facteur PEF (Penetration Enhancing factor) (Lycke et Norrby, 1966) augmenterait la capacité de pénétration du parasite dans la cellule-hôte au cours des phénomènes d'invasion. Il dégraderait, par exemple, la surface muqueuse des cellules-hôtes (Lycke *et al.*, 1975). La sécrétion d'une phospholipase A2 calcium-dépendante permettrait d'agir sur la fluidité membranaire de la cellule-cible par "digestion" de ses phospholipides (Saffer *et al.*, 1989 ; Thardin *et al.*, 1993 et Saffer et Scharzman, 1991).

La protéine ROP1 est associée à la membrane de la vacuole parasitophore pendant les quelques heures qui suivent l'invasion (Saffer *et al.*, 1992). L'anticorps monoclonal dirigé contre cette protéine bloque l'activité de PEF, suggérant que ROP1 pourrait faire partie de ce facteur (Schwartzman et Krug, 1989 et Ossorio *et al.*, 1992). Sur le plan

moléculaire, ROP1 possède une région N-terminal acide, riche en proline et une région C-terminal basique, riche en glycine (Ossorio *et al.*, 1992).

La protéine ROP2 assimilée à l'antigène de 54 kDa (Saavedra *et al.*, 1991) a été clonée sur la base de sa capacité à induire la prolifération d'un clone T CD4 humain. Cette molécule possède une région potentiellement transmembranaire. ROP2 ferait partie d'une famille de protéines basiques (ROP2, ROP3, ROP4, ROP7 et ROP8) qui interagissent avec la membrane de la vacuole parasitophore (Leriche et Dubremetz, 1991).

Les protéines ROP8, ROP9, ROP10 et ROP11 sont localisées dans le pédoncule des rhoptries (Leriche et Dubremetz, 1991). La séquence de la protéine ROP8 est actuellement identifiée (Beckers *et al.*, 1997).

- Molécules de Micronèmes

Communes au stade tachyzoïte et bradyzoïte, les trois molécules MIC1 (60 kDa), MIC2 (120 kDa) et MIC3 (90 kDa) sont localisées au niveau des micronèmes du parasite.

MIC3 est un homodimère constitué de deux sous-unités de 38 kDa reliées physiquement par des ponts disulfures (Achbarou *et al.*, 1991). Ces molécules secrétées avant l'invasion cellulaire (Carruthers et Sibley, 1997), seraient impliquées dans la reconnaissance de la cellule-hôte ou dans l'attachement du parasite avant l'invasion (Dubremetz *et al.*, 1993 ; Fourmaux *et al.*, 1996).

- Molécules de granules denses

L'exocytose des granules denses a été suggérée par l'observation de granules fusionnant avec les membranes qui entourent le parasite (Charif *et al.*, 1990) ; Leriche et Dubremetz, 1990). L'utilisation d'anticorps monoclonaux a permis de localiser ces molécules au niveau des granules denses mais également au niveau de la vacuole parasitophore. Parmi les antigènes secrétés en milieu acellulaire en présence de sérum (Darcy *et al.*, 1988), les antigènes des granules denses P24, GP28,5 et P21 sont présents aux deux stades parasitaires (Darcy *et al.*, 1990 et Torpier *et al.*, 1993).

Les composants des granules denses sont sécrétés dans la vacuole parasitophore (Cesbron-Delauw *et al.*, 1989 et Sibley et Boothroyd, 1992b). Les 7 antigènes de granules denses correspondent aux molécules GRA1, GRA2, GRA3, GRA4, GRA5, GRA6 et GRA7.

L'antigène GRA1 ou P23 reconnu par l'anticorps monoclonal TG17-43 (Charif *et al.*, 1990) est une protéine fixant le calcium (Cesbron-Delauw *et al.*, 1989) et qui présente une structure α -hélice-boucle- α -hélice. Cette molécule de sécrétion est distribuée de façon homogène dans la matrice de la vacuole parasitophore (Achbarou *et al.*, 1991a)

L'antigène GRA2 ou P28 ou GP28,5 reconnu par les anticorps monoclonaux F3G3 (Sibley et Sharma, 1987) et TG17-179 (Charif *et al.*, 1990) est un composant en étroite association avec le réseau intravacuolaire, sous le plasmalemme des parasites et dans la paroi des kystes (Sibley et Sharma, 1987, Charif *et al.*, 1990 et Torpier *et al.*, 1993). Cette protéine est glycosylée (O-glycosylation) sur des résidus sérine et thréonine (Charif *et al.*, 1990, Achbarou *et al.*, 1991a et Schwarz et Tomavo, 1993). GRA2 est un très bon immunogène de la phase chronique chez l'homme (Decoster *et al.*, 1988a) mais cette protéine est également reconnue par les sérums de rat, de lapin et de souris immunisés par les AES (Darcy *et al.*, 1988). Les 23 acides aminés N-terminaux constituent un peptide-signal. Une structure de deux α -hélices amphiphiles est potentiellement possible. Cette molécule pourrait alors former un pore et pourrait également être une protéine dont la fixation à la membrane du réseau intravacuolaire serait régulée par le calcium (Sibley et Boothroyd, 1992b).

L'antigène GRA3 (30 kDa) est associé au réseau de la vacuole parasitophore (Linder *et al.*, 1992) et à sa membrane (Achbarou et coll, 1991). Il constituerait un canal transporteur de métabolites au travers de cette membrane (Achbarou *et al.*, 1991a).

L'antigène GRA4 (40 kDa) est associé au réseau de la vacuole parasitophore. (Mévelec *et al.*, 1992). Cette molécule glycosylée, riche en proline, est certainement une protéine de structure de la vacuole parasitophore (Mévelec *et al.*, 1992).

L'antigène GRA5 ou P21 reconnu par l'anticorps monoclonal TG17-113 (Charif *et al.*, 1990) est associé, grâce à une région centrale transmembranaire, à la membrane de la vacuole parasitophore (Lecordier *et al.*, 1993) et à la paroi des kystes (Torpier *et al.*, 1993).

L'antigène GRA6 (32 kDa) possède une réactivité antigénique croisée avec GRA5 (Lecordier *et al.*, 1995). Il possède un domaine transmembranaire et des homologies avec des protéines de structure fibreuse du règne animal.

La protéine GRA7 (30 kDa) possède une région interne hydrophobe potentiellement transmembranaire encadrée par des régions hydrophiles (Jacobs *et al.*, 1998 et Fischer *et al.*, 1998)

c) Molécules spécifiques de stades parasitaires

Certaines molécules, notamment à la surface, ne sont exprimées qu'à certains stades du cycle parasitaire. Les antigènes de 67 kDa et 25 kDa sont caractéristiques de la membrane du sporozoïte et de la paroi de l'oocyste (Kasper *et al.*, 1984). Les protéines P18 (SAG 4, Odberg-Ferragut *et al.*, 1996), P21, P34, P36 (Tomavo *et al.*, 1991) et P20 (Omata *et al.*, 1989) sont des antigènes spécifiques du stade bradyzoïte et les protéines P22, P30 (Kasper, 1989) et P35 (Potasman *et al.*, 1986) du stade tachyzoïte.

Parmi les antigènes spécifiques du stade bradyzoïte, on trouve également les protéines de la paroi du kyste (MAG1) et les protéines du cytoplasme (BAG1, Hsp70 et LDH2). Le gène codant pour la protéine MAG1 a été isolé à partir de kystes matures (Parmley *et al.*, 1994). Cette protéine est abondamment présente dans la matrice des kystes et plus faiblement détectée dans la paroi kystique.

Le gène de la protéine BAG1 (Hsp30) a été décrit par Bohne (Bohne *et al.*, 1995) et Parmley (référencé alors comme le gène BAG5) (Parmley *et al.*, 1995). Cette protéine appartient à la famille des petites protéines de choc thermique de plantes (Hsp : Heat shock proteins). Cette homologie reflète probablement son implication, en réponse à un stress, dans le phénomène de conversion tachyzoïte-bradyzoïte. Une autre protéine Hsp, Hsp70 a été caractérisée (Weiss *et al.*, 1998).

La protéine LDH2 (Lactate déshydrogénase) possède plus de 71% d'homologie avec la protéine LDH1 spécifique du stade tachyzoïte (Yang et Parmley, 1995). Elle catalyse la transformation de l'amylopectine en lactate (Denton *et al.*, 1996) et participerait à l'adaptation du bradyzoïte en milieu plus acide.

Il existe, cependant, des antigènes communs à plusieurs stades du parasite. Ainsi, les antigènes P63, P43, P39 et P28,5 (Darcy *et al.*, 1990) de même que les antigènes des granules denses P24 et P21 (Cesbron-Delaw *et al.*, 1989 ; Charif *et al.*, 1990 et Torpier

et al., 1993) sont des molécules communes aux stades tachyzoïte et bradyzoïte. Les antigènes de rhoptries de 55 et 60 kDa sont également communs aux différents stades tachyzoïte, bradyzoïte et sporozoïte (Sadak *et al.*, 1988).

d) Autres molécules

Certaines molécules communes à de nombreux organismes sont retrouvées à l'intérieur du parasite comme l'actine, la myosine, la tubuline, la calmoduline mais également deux ADN polymérases (Makioka *et al.*, 1993 ; Binas et Johnson, 1998). Ces molécules pourraient expliquer certaines réactions sérologiques croisées non spécifiques de *Toxoplasma gondii*.

L'ADN polymérase décrite par Makioka (Makioka *et al.*, 1993) peut être assimilée, en fonction de l'action de certains inhibiteurs spécifiques, à une ADN polymérase α , β , δ ou ϵ mais n'est pas reconnue par un anticorps monoclonal spécifique de l'ADN polymérase α . L'activité de cet enzyme, plus élevée pour la souche virulente RH que la souche avirulente Me49, reflète sa contribution dans la multiplication rapide des souches virulentes (Makioka et Ohtomo, 1995). Le gène codant pour la sous unité catalytique d'une ADN polymérase α a également été cloné (Binas et Johnson, 1998). La séquence polypeptidique, en comparaison avec son homologue humain, montre l'absence d'une région conservée "A" et la présence d'une région supplémentaire regroupant quatre cystéines. Ces différences pourraient se répercuter sur la structure secondaire et tertiaire et être exploitées dans la recherche de nouvelles drogues anti-toxoplasmiques.

D'autres molécules inattendues ont été retrouvées chez *Toxoplasma gondii*. Ainsi, l'analyse d'extraits d'acétone ou d'acide méthanoïque de trophozoïtes par HPLC (High Pressure Liquid Chromatography) a permis d'identifier de la protochlorophylle a et de la chlorophylle a (Hackstein *et al.*, 1995). La chlorophylle a est une molécule caractéristique des complexes photosynthétiques PS I et PS II des organismes photosynthétiques (Hackstein *et al.*, 1995). La présence supposée de la protéine D1 (partie obligatoirement intégrante du complexe PS II) (Hackstein *et al.*, 1995) expliquerait la sensibilité du toxoplasme aux dérivés des triazines (toltrazuril). Cet équivalent de complexe PS II pourrait intervenir dans la protection contre des radicaux oxygénés lors de la pénétration du parasite dans la cellule-hôte.

Récemment, deux α -amylases (une membranaire, l'autre cytoplasmique) ont été purifiées et caractérisées (Ferrer *et al.*, 1999). L' α -amylase membranaire semble apparentée aux amylases animales et à celles de certains protozoaires.

D) La toxoplasmose

L'incidence de la toxoplasmose estimée par des tests sérologiques varie de 20 à 90% selon les pays. En France, 80% (Desmonts *et al.*, 1965) de la population parisienne seraient infectés alors qu'aux Etats-Unis seulement 30 à 60% (Frenkel, 1990) de la population seraient concernés. D'une façon générale, elle semblerait plus fréquente dans les aires géographiques d'origine du chat (Europe et Afrique) (Dupouy-Camet *et al.*, 1993a). Actuellement, ce pourcentage est descendu à 60% en France, vraisemblablement en raison de l'amélioration des conditions d'hygiène et des habitudes alimentaires (Pinon *et al.*, 1985). Cependant, en France, où la viande est souvent consommée saignante, la prévalence chez les femmes enceintes atteint plus de 50% (Ancelle *et al.*, 1996).

La toxoplasmose résulte de deux modes de contamination différents. L'infestation peut s'effectuer par ingestion de viandes parasitées (kystes) ou par des aliments souillés (oocystes) conduisant à deux formes de toxoplasmose acquise cliniquement distinctes. Elle peut également se transmettre par voie transplacentaire, entraînant la toxoplasmose congénitale.

Beaucoup plus rarement, le parasite peut être transmis par transfusion ou par greffe d'organe.

La toxoplasmose est également un problème de santé vétérinaire car elle est responsable de plus de 50% des avortements spontanés chez les ovins (Buxton, 1993).

1) La toxoplasmose acquise

a) Chez les sujets immunocompétents

- Formes apparentes

Après pénétration des bradyzoïtes ou des sporozoïtes dans les cellules épithéliales de l'intestin, l'incubation et l'invasion sont de durée variable. A ce stade de la maladie, la toxoplasmose généralement asymptomatique peut se manifester sous la forme d'un syndrome mononucléosique associant fièvre (38-38,5°C), asthénie et lymphadénopathie au niveau des chaînes ganglionnaires cervicales moyennes et postérieures (Revol, 1964). On observe une élévation des monocytes avec des lymphocytes hyperbasophiles. Les

manifestations de type hépatomégalie ou splénomégalie de même que des douleurs musculaires ou articulaires sont rares.

Cette affection bénigne est généralement d'une évolution favorable car, au fur et à mesure de l'apparition des anticorps spécifiques, les formes circulantes disparaissent progressivement et la parasitémie diminue. Elle aboutit à une guérison spontanée ne nécessitant pas de traitement thérapeutique antitoxoplasmique.

Cependant, dans certains organes réputés pour être pauvres en anticorps (muscles striés, coeur, cerveau et rétine), les parasites s'enkystent. La toxoplasmose chronique se substitue alors à la phase aiguë de la maladie. La réinfection endogène (libération de bradyzoïtes intrakystiques) ou orale est habituellement asymptomatique en absence d'immunodépression car les bradyzoïtes sont détruits par les anticorps et les macrophages (Ferguson *et al.*, 1989).

Cependant, des formes rares symptomatiques ont été observées malgré une réponse immune préexistante et un terrain immunocompétent. Elles s'expliqueraient par l'intensité de l'inoculum et la virulence de la souche (Fortier *et al.*; 1991a et Fortier *et al.*, 1991b).

Les formes graves chez les sujets immunocompétents sont extrêmement rares. Elles s'observent presque toujours après une contamination massive de toxoplasmes lors d'accidents de laboratoire. Ces formes cliniques correspondent aux formes viscérales (cérébrales, musculaires, cardiaques et pulmonaires). En absence de diagnostic et de traitements rapides, l'évolution peut parfois être fatale.

- Formes inapparentes

Ce sont les plus fréquentes, sans le moindre signe clinique décelable, d'où l'intérêt du dépistage sérologique systématique chez les femmes enceintes.

b) Chez les sujets immunodéprimés

L'augmentation du nombre de cas de sarcome de Kaposi et d'encéphalite toxoplasmique (Vilaseca *et al.*, 1982 et Remington, 1982), principale infection opportuniste du système nerveux central chez les patients atteints d'un syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA), est corrélée à l'émergence de l'infection par le VIH

(virus de l'immunodéficience humaine). L'encéphalite toxoplasmique affecte 25% des patients sidéens européens et 5 à 10% des cas aux Etats-Unis (McCabe et Remington, 1988 et Luft et Remington, 1988). Chez la plupart de ces patients, il n'y a pas d'augmentation de la réponse humorale caractéristique d'une infection aiguë, ce qui rend le diagnostic sérologique difficile et indéterminé (Luft *et al.*, 1984a). La toxoplasmose peut être provoquée par une primo-infection mais plus fréquemment, il s'agit d'une réactivation des foyers d'infection latents (Frenkel *et al.*, 1975).

D'autres organes peuvent être affectés. Ainsi des cas de toxoplasmose pulmonaire avec présence de toxoplasmes dans les liquides broncho-alvéolaires (Catterall *et al.*, 1986), des péritonites (Israelski *et al.*, 1988), des chorioretinites (Holland, 1989) et d'importantes lésions du myocarde (Luft *et al.*, 1983) ont été recensés. Dans le cerveau, les lésions provoquées sont le plus souvent nécrotiques et décelables par imagerie, mais quelques cas d'encéphalites toxoplasmiques diffuses non nécrotiques, plus difficiles à diagnostiquer, ont été décrits (Gray *et al.*, 1989).

Des encéphalites toxoplasmiques peuvent se développer suite à un traitement immunodépresseur chez les receveurs de greffes de moelle osseuse ou de transplantation d'organe (Araujo et Remington, 1987 et Reynolds *et al.*, 1966 et Luft *et al.*, 1988).

2) La toxoplasmose congénitale

a) Chez l'homme

En France, la fréquence de la toxoplasmose congénitale est d'environ 1 à 3 ‰ des naissances (Dupouy-Camet *et al.*, 1993) et le nombre de séroconversion quant à lui est estimé entre 4 à 16 ‰ (suivi réalisé sur 35000 femmes non prémunies) (Dupouy-Camet *et al.*, 1993) avec un risque global de transmission foetal inférieur à 30%. Ce risque augmente au cours de la grossesse (6% à 13 semaines, 40% à 26 semaines et 72% à 36 semaines) (Dunn *et al.*, 1999).

La toxoplasmose congénitale résulte de la transmission du parasite au fœtus par voie transplacentaire et fait suite à une primo-infection maternelle contractée en cours de grossesse. Les deux premiers cas de toxoplasmose congénitale ont été décrits en 1941 (Sabin, 1941). L'un, mortel, est à l'origine de l'isolement de la souche RH. L'autre correspondait à une chorioretinite.

Le risque d'infection foetale est d'autant plus grand que la contamination maternelle a été tardive. Tandis que l'atteinte foetale est d'autant plus sévère que la transmission a été précoce. Le taux de passage à travers le placenta augmente au cours de la grossesse (12% entre la 6^{ième} et la 16^{ième} semaines, 20% entre la 16^{ième} et la 28^{ième} semaine et jusqu'à 80% à partir de la 28^{ième} semaine) (Dafos *et al.*, 1988). L'atteinte foetale peut donc être symptomatique et peut également correspondre à des formes cliniques graves voir mortelles (Ambroise-Thomas et Garin, 1984). Une transmission survenant avant les 3 premiers mois de grossesse peut être responsable de micro ou macrocéphalie, d'hydrocéphalie et de calcifications intracrâniennes, donnant des enfants présentant des retards psychomoteurs considérables, des signes d'hypotonie et de somnolence mais également atteints de troubles végétatifs et de chorioretinites pigmentaires maculaires. Elle peut également être responsable de mort foetale et d'avortement spontané (8% des cas de toxoplasmose congénitale). Suite à une contamination au delà du 4^{ième} mois, le nouveau-né peut être atteint d'encéphalomyélite dont les signes cliniques persistent ou non à la naissance, de retards psychomoteurs et d'apparition de lésions oculaires. Lors d'une contamination très tardive entre le 6^{ième} et le 9^{ième} mois, on observe des formes inapparentes dont la traduction est uniquement sérologique. Cependant, des chorioretinites apparaissant plusieurs mois voire plusieurs années après la naissance, ont été observées et justifient un suivi médical de ces patients (Ambroise-Thomas et Pelloux, 1993 ; Frenkel, 1988 et Fricker-Hidalgo *et al.*, 1996).

b) Chez le mouton

La toxoplasmose congénitale chez le mouton est un véritable problème de santé vétérinaire car elle est responsable de 50% des avortements dans les régions d'élevage intensif (Buxton, 1993). Chez la brebis, l'avortement a lieu lors d'une primo-infection en cours de gestation. Comparée à une infection intervenant au moment de la fécondation ou peu après, le toxoplasme est plus pathogène pour le foetus durant le deuxième mois de gestation. Les lésions sont essentiellement cérébrales. Les avortements dus au toxoplasme n'affectent pas les gestations ultérieures des brebis (Nicolas et Pestre-Alexandre, 1993)

II) POUVOIR PATHOGENE, MECANISMES DE DEFENSE ET MODELES EXPERIMENTAUX D'ETUDE

A) Souches et virulences

La notion de souches a été établie à partir de l'obtention de différents isolats présentant un pouvoir pathogène très variable selon les espèces animales infectées. Le terme "virulence" (du latin *virulentia* ou *virus* : poison) associé aux différentes souches du toxoplasme fait référence à l'intensité de leur pouvoir pathogène, englobant pouvoir invasif et pouvoir infectieux. Leur virulence a été reconnue comme très variable selon les souches de toxoplasme étudiées (Jacobs et Lunde, 1957). Les souches virulentes se multiplient plus rapidement, *in vitro*, que les souches non virulentes (Makioka et Ohtomo, 1995). Des expériences complémentaires *in vitro* ont également confirmé que les souches faiblement virulentes de multiplication lente, sont incapables de détruire un tapis cellulaire d'où leur assimilation aux souches infectant l'homme (Kaufman *et al.*, 1958). Généralement, après des passages répétés en laboratoire, il se produit une augmentation de la virulence. Cependant, cette augmentation dépend de l'espèce animale chez laquelle s'effectuent les passages. Ainsi, une souche avirulente entretenue chez la souris voit progressivement sa virulence augmenter, alors qu'elle reste avirulente si elle est entretenue sur des embryons de poulet.

Cette variation de virulence a été confirmée pour le stade oocyste (Dubey et Frenkel, 1973) mais également montrée entre deux souches kystogènes (Suzuki, *et al.*, 1991)

La souche virulente la plus étudiée et la plus utilisée en laboratoire est la souche RH. Cette souche isolée à partir d'un prélèvement humain (Sabin, 1941) a le grand avantage d'être facilement entretenue *in vitro* en laboratoire (passages successifs chez la souris ou sur culture de fibroblastes humains).

L'étude de la différence de virulence des souches s'est faite au niveau antigénique, enzymatique et plus récemment génétique.

1) Variation antigénique des souches

Une variation antigénique parmi 4 souches a été montrée grâce à des techniques d'immunofluorescence (Suggs *et al.*, 1968). De même et à partir d'un autre

modèle d'infection animal (lapin), le profil antigénique des souches RH, P et C était différent en Western blot et en immunoprécipitation (Ware et Kasper, 1987). Dans cette étude, les auteurs identifient des antigènes communs aux trois souches mais surtout des antigènes communs aux souches P et C et non détectables dans la souche RH. D'autres travaux ont permis de révéler la présence d'un antigène de 23 kDa spécifique des souches virulentes (Groß *et al.*, 1991). Des différences antigéniques sont également observées parmi les antigènes d'excrétion-sécrétion, entre les souches RH et Me49 (Rahmah et Khairul Anuar, 1992).

Les tentatives de caractérisation de la virulence par des antigènes différents sur les souches avirulentes et virulentes ont été pour la plupart des échecs. Ainsi, après infection de souris par la souche virulente RH ou par les souches moins virulentes C56 et C37 (Figure 6), l'examen des anticorps obtenus a permis de conclure que tous les sérums des souris infestées reconnaissent les mêmes antigènes de surface (Handman et Remington, 1980).

2) Variation enzymatique des souches

Trois zymodèmes ont été définis dans un premier temps à partir de l'étude de 39 isoenzymes de 7 souches de *Toxoplasma gondii* (Dardé *et al.*, 1988). Un zymodème est défini comme un groupe de souches dont certains de leurs isoenzymes présentent le même profil électrophorétique (isoenzyme = formes moléculaires ayant la même activité enzymatique). Ensuite, une étude complémentaire réalisée à partir de 35 isolats parasitaires a permis de confirmer l'existence des 3 zymodèmes décrits tout en ajoutant deux supplémentaires (Dardé *et al.*, 1992).

Le zymodème 1 comprend 6 souches très pathogènes pour la souris qui ne peuvent pas produire d'oocystes. Les zymodèmes 2, 3 et 4 comprennent des souches moins pathogènes et productrices d'oocystes. Le cinquième zymodème comprend une seule souche très pathogène pour la souris.

3) Polymorphisme génétique

Les différences génétiques mises en évidence par analyse "RFLP" de l'ADN génomique (Restriction Fragment Length Polymorphism) à partir d'une séquence répétée de 353 pb (TGR1_E), ont confirmé l'existence d'un polymorphisme génétique parmi 6 souches de toxoplasme (Cristina *et al.*, 1991a). Cette étude a permis de définir 4 profils

FIGURE 6 : Principales souches de *Toxoplasma gondii*

| SOUCHE | ORIGINE | PATHOGENICITE CHEZ LA SOURIS | REFERENCE |
|-----------|--|---------------------------------|----------------------------------|
| RH | Isolée en 1939 d'un cas d'encéphalite aiguë humaine aux USA | Souche virulente | Sabin, 1941 |
| P | Isolée d'un mouton en Californie, puis d'un placenta humain en 1983 Dérivée de la souche Me49 | Souche virulente | Kasper <i>et al.</i> , 1985 |
| C | Isolée d'un chat infecté en 1976 à Darmouth, USA, puis isolée d'un placenta humain en 1981 à Paris | Souche chronique | Pfefferkorn <i>et al.</i> , 1977 |
| C56 | Isolée d'ovaire de poulet en 1961 aux USA | Virulence modérée | Araujo <i>et al.</i> , 1976 |
| 76K | Isolée d'un cerveau de cobaye à Marseille en 1970 | Souche chronique | Laugier et Quilici, 1970 |
| Me49 | Isolée d'un muscle de mouton | Souche avirulente | Suzuki <i>et al.</i> , 1989 |
| Prugniaud | Isolée d'un organe humain de nouveau-né à Limoges (France) en 1964 | Souche chronique | Martrou <i>et al.</i> , 1965 |

de restriction de l'ADN génomique mais sans corrélation apparente avec la virulence des souches.

De même, une comparaison de l'ARN 18S n'a pas permis d'établir une corrélation entre la virulence des souches et les variations de la séquence des gènes (Luton *et al.*, 1995).

Par contre, l'analyse d'un gène unique *SAG1* par "PCR-RFLP" de 28 souches parasitaires provenant d'hôtes et d'aires géographiques différents, a permis de montrer que les 10 souches virulentes sont génétiquement homogènes en opposition aux souches peu virulentes reconnues comme plus hétérogènes (Sibbey et Boothroyd, 1992c). Les souches virulentes semblent dériver d'un même clone (Boothroyd et Sibley, 1993) et la structure de cette population clonale renforce la notion d'une seule espèce pour le toxoplasme (Tibayrec, 1993). Le locus multiallélique *SAG1* paraît ainsi être un bon marqueur génétique pour identifier les souches entre elles car l'un des deux allèles semble être présent uniquement dans les souches virulentes (Boothroyd et Sibley, 1993).

Une étude similaire, à partir d'une analyse par RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic DNA-PCR), a montré un polymorphisme de l'ADN pour 11 souches ou isolats de *Toxoplasma gondii* infectant la souris. Ces 11 souches ou isolats ont été répartis en deux groupes : le premier correspondant à 6 souches virulentes (RHu, RHa, ENT, PT, GT1 et CT1) et le deuxième à 5 souches avirulentes (Me49, CEP, PLK, Tg51 et TPR) (Guo et Johnson, 1995).

La corrélation entre génotype et virulence semble acquise et une classification parasitaire a pu être établie (Howe et Sibley, 1995 et Sibley et Howe, 1996). Les souches de type 1 sont très virulentes pour la souris (RH et P). Les souches de type 2 sont avirulentes et s'enkystent rapidement (Me49, Prugniald, 76K,...). Elles sont souvent associées aux toxoplasmoses humaines (Howe *et al.*, 1997). Les souches de type 3 sont avirulentes et infectent rarement l'homme (C56, C, NED, ...). L'homogénéité génétique des souches virulentes pourrait s'expliquer en partie par leur mode de reproduction asexuée (sans passer par le chat). Plus remarquablement, une souche virulente est incapable de croiser avec une souche peu virulente lorsqu'elles se reproduisent chez un même chat. Comme ces deux populations se reproduisent indépendamment l'une de l'autre dans des niches écologiques communes, la notion de spéciation peut être envisagée.

Sur le plan clinique, cette notion de spéciation qui décroïssonne les souches virulentes des souches peu virulentes suggère que, face à une toxoplasmosse humaine, la conduite à tenir pourrait être différente voir adaptée au type de souche infectante.

B) Mécanismes de défense chez l'homme et les rongeurs

Lorsqu'un agent pathogène potentiel envahit un hôte, il affronte immédiatement un ensemble de mécanismes de défense immunitaire (du latin *immunis* : exempt) dite non spécifique, également appelée immunité naturelle. Cette immunité qui constitue une première ligne de défense est généralement suffisante pour arrêter l'infection. En cas d'échec, la maladie se développera entraînant l'activation des défenses immunitaires spécifiques, particulièrement dirigées contre le germe responsable, conduisant souvent à la guérison. Parallèlement, il s'établit une mémoire spécifique empêchant le développement d'une nouvelle maladie infectieuse par le même germe d'où l'appellation de mémoire immunitaire.

1) Toxoplasme et immunité non spécifique

Les mécanismes de défense générale intervenant quelque soit l'organisme pathogène peuvent être regroupés en quatre catégories : les barrières générales, physiques, chimiques et biologiques. Nous nous attarderons bien sûr sur les barrières de défense en relation avec le parasitisme du toxoplasme.

a) Les barrières générales

Plusieurs facteurs directs (génétiques, âge, physiologie, nutrition, fièvre,...) ainsi que plusieurs facteurs indirects (statut socio-économique, conditions de vie, hygiène personnelle et alimentaire...) influencent les relations hôte-parasite.

Parmi les facteurs directs, la fièvre (Prescott *et al.*, 1995) pouvant être observée au cours d'une toxoplasmose acquise, peut accroître les défenses de l'hôte en stimulant les leucocytes et leur pouvoir de destruction par phagocytose et favoriser le développement de l'immunité spécifique via l'interleukine 1.

En ce qui concerne les facteurs indirects, l'hygiène et les habitudes alimentaires (ingestion ou non de viandes crues, lavage des fruits et légumes), les répartitions géographiques des félinés (Europe, Moyen-orient, ...) et l'habitude des personnes à posséder ou non un chat domestique sont susceptibles d'interférer sur le risque d'infection (Kapperud *et al.*, 1996).

b) Les barrières chimiques : les cytokines

Les hôtes mammifères dont l'homme ont un arsenal chimique avec lequel ils combattent l'attaque continue des organismes parasites. Certains agents chimiques sont spécifiques de l'organe qu'ils protègent (suc gastrique, urée, ...). Les anticorps et le complément, la fibronectine qui recouvre les récepteurs de certaines cellules épithéliales et empêche la fixation de nombreuses bactéries, les hormones comme les oestrogènes dont l'action sur la microflore vaginale a été décrite, les cytokines comme les interférons, le facteur de nécrose tumorale α (Tumor necrosis factor α) et les interleukines, constituent également des agents chimiques défensifs.

Les deux compartiments de l'immunité (spécifique et non spécifique) agissent de façon concertée. Les anticorps produits par les lymphocytes aident les cellules phagocytaires à identifier leurs cibles. Les lymphocytes produisent des lymphokines qui viennent stimuler les cellules phagocytaires, favorisant ainsi une destruction plus efficace des agents infectieux. Les macrophages à leur tour viennent en aide aux lymphocytes en transportant les antigènes de la circulation périphérique vers les ganglions lymphatiques et autres organes lymphoïdes. Là, les antigènes sont présentés aux lymphocytes sous une forme qu'ils peuvent reconnaître.

Après les étapes-clés, marquées par la découverte du rôle du thymus et de l'importance du macrophage, l'immunologie a progressé par la mise en évidence d'une communication intercellulaire (lymphocyte B-lymphocyte T- macrophage) grâce à des substances appelées interleukines (entre lymphocytes) et cytokines (terme étendu à toutes les cellules du système immunitaire). Le surnageant de culture de lymphocytes T immuns est capable d'activer les macrophages et de leur permettre de digérer les parasites phagocytés. Un même surnageant obtenu à partir de lymphocytes non immuns est sans effet sur les macrophages et la destruction des parasites. Ces expériences mettent en évidence l'existence de molécules solubles libérées par les lymphocytes et assurant un relais de communications intercellulaires "lymphocyte-macrophage".

- Les interférons

L'interféron γ (IFN- γ) semble jouer un rôle prépondérant dans la résistance à l'infection (Suzuki *et al.*, 1988a et Dimier et Bout, 1997). Chez la souris, l'interféron γ endogène serait impliqué dans la prévention de l'encéphalite toxoplasmique. En effet, des animaux chroniquement infestés recevant chaque semaine des injections d'anticorps monoclonaux anti-IFN- γ développent une encéphalite sévère. De plus, la présence de

tachyzoïtes dans la périphérie des kystes suggère chez ces animaux la rupture des kystes (Suzuki *et al.*, 1989). La diminution de l'interféron γ également observée chez les malades du SIDA pourrait ainsi expliquer la réactivation toxoplasmique. Une approche thérapeutique a été testée chez la souris, où l'injection d'interféron γ recombinant exogène empêche la mort de l'animal infesté (McCabe *et al.*, 1984). Un traitement chez des souris chroniquement infestées réduit la réponse inflammatoire dans le cerveau (Suzuki et Remington, 1990). *In vitro*, L'INF- γ induit la synthèse du TNF- α par les cellules de la lignée des macrophages. De plus, l'effet synergique de l'INF- γ et du TNF- α permet la production d'IL-2 et d'IL-4 par les lymphocytes T CD4⁺ (Schüler *et al.*, 1997). Chez le rat nude, l'interféron γ recombinant, permet à 25% des rats traités, une survie de 70 jours au lieu de 19 (Benedetto *et al.*, 1991). Pour finir, un traitement par un anticorps monoclonal anti-interféron γ supprime l'immunité conférée par les cellules T CD8⁺ de souris vaccinées par le mutant thermosensible "ts-4" (Pfefferkorn et Pfefferkorn, 1976 ; Suzuki et Remington, 1990).

Chez l'homme, l'interféron γ inhibe la multiplication des toxoplasmes dans les fibroblastes par dégradation enzymatique du tryptophane (Pfefferkorn *et al.*, 1986). Il active les cellules endothéliales leur permettant d'inhiber la réplication parasitaire (Woodman *et al.*, 1991). L'interféron γ correspond également à un activateur puissant du métabolisme oxydatif des macrophages et de leur activité antiparasitaire (Black *et al.*, 1987 et Nathan *et al.*, 1983).

Un léger effet inhibiteur sur la réplication du parasite *in vitro* a été observé pour l'interféron α (Wilson et Westall, 1985) et l'interféron β (Schmitz *et al.*, 1989).

- Le TNF- α (Tumor Necrosis Factor α)

Le rôle du TNF- α reste très controversé (Black *et al.*, 1989, et Chang *et al.*, 1990). Cependant, le TNF- α , en synergie avec l'interféron γ , est capable d'activer des macrophages murins contre le toxoplasme (Chang *et al.*, 1990). Des expériences *in vitro* ont montré que le TNF- α possède un effet inhibiteur sur la prolifération des parasites dans les astrocytes murins (Schlüter *et al.*, 1997).

Un traitement de souris C57 Bl/6J avec un polyclonal anti-TNF- α induit une augmentation du nombre de kystes lors d'une infection chronique par la souche C56. Par contre, l'injection d'une molécule recombinante du TNF- α murin présente un effet contraire (Chang *et al.*, 1992).

Chez la souris C57Bl/6, 7 jours après l'infection par voie orale (kystes de la souche Me49), une augmentation des lymphocytes CD4⁺, de l'ARNm de l'INF- γ , du TNF- α et une induction de la NO synthase, est observée dans les cellules mononucléaires de la lamina propria de l'intestin grêle. Un traitement par un anticorps monoclonal anti-TNF- α inhibe l'induction de la NO synthase sans affecter l'expression de l'INF- γ . Les auteurs suggèrent que le NO induit par l'INF- γ et le TNF- α via l'activation de la NO synthase, joue un rôle déterminant dans le développement de nécroses des cellules intestinales et contribue à la mortalité précoce de ces souris génétiquement sensibles à l'infection (Liesefeld *et al.*, 1999).

Contrairement aux observations précédentes, le TNF- α joue aussi un rôle protecteur en prévention de la prolifération parasitaire dans les cellules de l'intestin grêle (Liesefeld *et al.*, 1999). De même, des souris déficientes en récepteur TNF- α meurent suite à une toxoplasmose encéphalique.

Ces différents résultats montrent que le TNF- α joue un double rôle durant une toxoplasmose acquise.

- Les interleukines

L'interleukine 1 β (IL-1 β) améliore la production d'INF- γ induite par l'IL-12 (Hunter *et al.*, 1995). Un traitement anti-IL-1 β inhibe la production d'INF- γ via l'IL-12.

L'interleukine 2 (IL-2) recombinante réduit le nombre de kystes dans le cerveau de souris infestées par une dose létale de tachyzoïtes et réduit la mortalité (Sharma *et al.*, 1985). Chez la souris, cet effet protecteur semble corrélé avec l'augmentation de l'activité de cellules NK (Natural Killer) (Sharma *et al.*, 1985) et paraît plutôt lié chez le rat à l'activation des cellules LAK (Lymphokine Activated Killer) (Dannemann *et al.*, 1989).

Certaines interleukines favorisent la survie des parasites. *In vitro*, l'Il-6 augmente la réplication intracellulaire du toxoplasme après son invasion dans les macrophages (Beaman *et al.*, 1992). Chez un double mutant IL-6^{-/-} murin, le nombre de kystes cérébraux (souche Me49) augmente significativement ainsi que la prolifération des tachyzoïtes au niveau des aires inflammatoires (Suzuki *et al.*, 1997). Par contre, chez les souris non mutantes, l'Il-6 confère une activité protectrice contre le développement de la toxoplasmose encéphalique car elle est capable de stimuler la production d'INF- γ et d'induire l'infiltration et l'accumulation de différents lymphocytes T dans le cerveau

(augmentation du pourcentage des lymphocytes T γ/δ et des lymphocytes CD4⁺ α/β mais diminution de celui des lymphocytes T CD8⁺ α/β) (Suzuki *et al.*, 1997).

L'IL-8 est une substance proinflammatoire et chimio-attractive vis-à-vis des neutrophiles. Cette molécule résulte d'une réponse postérieure à la lyse cellulaire mais dépendante de l'invasion parasitaire. C'est pourquoi, l'IL-8 est détectée dans le surnageant de fibroblastes lysés après infection. La réponse IL-8 est médiée par l'IL-1 α dans les cellules HeLa mais dépend également de la libération de facteurs paracrines. L'IL-8 favorise l'arrivée des neutrophiles au niveau des sites inflammatoires créés au cours d'une toxoplasmose acquise ou d'une réactivation toxoplasmique. Cette interleukine contribue donc indirectement via les neutrophiles à la résistance de l'hôte face à l'infection parasitaire (Denney *et al.*, 1999).

L'IL-10, médiée par l'interféron γ , inhibe l'activité des macrophages à tuer le toxoplasme uniquement si l'IL-10 est administrée avant ou en même temps que l'interféron γ (Beaman *et al.*, 1992). L'IL-10 est capable de bloquer la synthèse d'IFN- γ en inhibant la production d'IL-12 produite par les macrophages (D'Andrea *et al.*, 1993). L'IL-10 agirait comme un modulateur de la réponse immunitaire car elle évite une altération des tissus de l'hôte par une exagération de la réponse immunitaire (Gazzinelli *et al.*, 1996).

L'IL-12 libérée par les macrophages, stimule la synthèse d'INF- γ par les lymphocytes T (CD4⁺, CD8⁺ et γ/δ) et les cellules NK (Gazzinelli *et al.*, 1994). L'IL-12 agit avec le TNF- α pour induire la production d'INF- γ par les cellules NK (Schartonkersten, 1995).

c) Les barrières cellulaires

Lorsqu'un organisme a percé les premières lignes de défense, il rencontre en seconde ligne des cellules pour la plupart dérivées de la moelle osseuse et qui correspondent à des phagocytes du système réticulo-endothélial (macrophage, monocytes et cellules associées).

- Les cellules phagocytaires : macrophages et neutrophiles

Les tachyzoïtes pénètrent dans les macrophages péritonéaux normaux non stimulés et se multiplient à l'intérieur d'une vacuole parasitophore qui ne s'acidifie pas

(Sibley *et al.*, 1985a), ne fusionne pas avec les lysosomes (Jones et Hirsch, 1972) et n'induit pas de réponse oxydative (Wilson *et al.*, 1980). Par contre, les vacuoles qui contiennent des toxoplasmes morts ou opsonisés fusionnent avec les lysosomes (Jones et Hirsch, 1972), puis s'acidifient (Sibley *et al.*, 1985a) permettant alors, une destruction du parasite. Dans ces conditions, des mécanismes dépendants de l'oxygène sont mis en jeu. Des dérivés oxygénés actifs sont produits (peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , radical hydroxyle OH° et anion superoxyde $O_2^{\circ-}$) (Murray *et al.*, 1979 et 1985a, et Hughes, 1988a). Cette action est renforcée par l'activation de la NADPH oxydase favorisant ainsi une augmentation de l'activité oxydative des macrophages (De Carvalho et De Souza, 1989).

En plus des mécanismes oxygène-dépendants, des mécanismes oxygène-indépendants peuvent également inhiber la multiplication du parasite. En effet, un apport exogène de superoxyde dismutase ou de catalase, enzymes intervenant dans l'élimination des dérivés oxygénés actifs, inhibe la fusion entre les lysosomes et les vacuoles parasitophores des macrophages péritonéaux murins activés par des lymphokines (mécanisme oxygène-dépendant). Cet apport inhibe, également, la réplication des tachyzoïtes intracellulaires (mécanisme oxygène-indépendant) qui auraient échappé ou résisté à l'activité antiparasitaire des macrophages activés, tout en n'affectant pas le nombre de parasites survivant 18 heures après l'infection des cellules (Sibley *et al.*, 1985b).

Contrairement à la souris, chez le rat, des macrophages péritonéaux non activés sont capables de détruire les parasites intracellulaires par un mécanisme non-oxydatif (McCabe et Remington, 1986).

Chez l'homme, les macrophages péritonéaux ou alvéolaires non stimulés sont également capables d'éliminer les toxoplasmes par un mécanisme non-oxydatif (Catterall *et al.*, 1987). Cette activité antiparasitaire est augmentée par un mécanisme non-oxydatif lorsque les macrophages sont stimulés par l'interféron γ , s'y ajoute également un mécanisme oxydatif (Murray *et al.*, 1985b).

La destruction des parasites dans les macrophages peut donc provenir de deux mécanismes différents, oxygène-dépendant et oxygène-indépendant mais avec une prépondérance pour le premier.

In vitro, les macrophages murins C57BL/6J sont capables d'induire la production d'un peptide hypotenseur, l'adrénomédulline, suite à une stimulation par des antigènes solubles de *Toxoplasma gondii*, de l'INF γ ou par des lipopolysaccharides d'*Escherichia*

coli. Ce peptide possède également une activité anti-microbienne directe. *In vivo*, les lipopolysaccharides augmentent la quantité d'ARNm de ce peptide au niveau du foie, de la rate et des poumons. Ces expériences montrent le rôle possible des macrophages via l'adrénomédulline dans la physiopathologie de la septicémie ou du choc septique (Zaks-Zilberman *et al.*, 1998).

Les tachyzoïtes sont capables de proliférer dans 25 à 35% des neutrophiles humains (Nakao et Konishi, 1991a et 1991b). Par contre, dans ces cellules, l'opsonisation des parasites provoque une mort rapide de ces derniers.

- Les cellules NK (Natural Killer)

Le rôle des cellules NK dans l'immunité dirigée contre le toxoplasme reste controversé à ce jour.

Les cellules NK de souris infectées 3 jours auparavant par des tachyzoïtes (souche RH) sont hautement cytotoxiques pour les toxoplasmes extracellulaires par contact direct entre la cellule et le toxoplasme (Hauser *et al.*, 1986). Au contraire, cette population cellulaire ne présente pas d'activité létale vis-à-vis du parasite lorsque les souris sont infectées oralement par des oocystes (Hugues *et al.*, 1988b).

Cette absence d'activité cytotoxique a également été observée pour des cellules NK humaines (Dannemann *et al.*, 1989).

2) Toxoplasme et immunité spécifique à médiation cellulaire

L'infection par le toxoplasme induit une réponse immunitaire spécifique protectrice contre la réinfection. Cette réponse est la barrière ultime de défense pour protéger l'hôte lorsque les défenses non spécifiques sont enfoncées. Bien que les réponses immunitaires humorales et cellulaires soient complémentaires et bien que la prépondérance de l'immunité à médiation cellulaire soit généralement admise (figure 7), la part respective de ces deux composantes n'est pas entièrement clarifiée et dépend surtout de l'hôte considéré.

La résistance à la réinfection, bien établie chez l'homme immunocompétent et chez de nombreuses espèces animales, apparaît 2 à 4 mois après l'infection initiale.

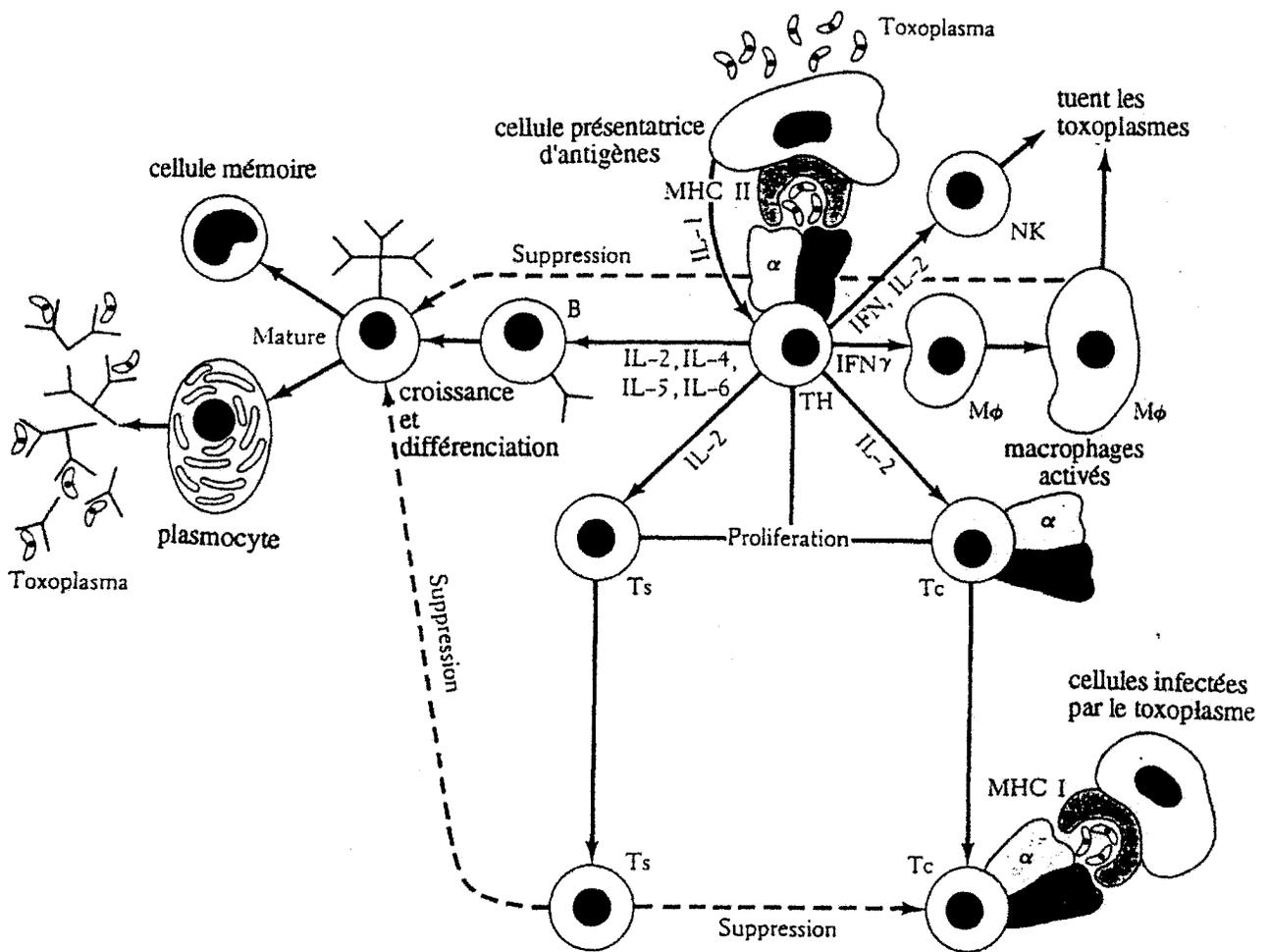


FIGURE 7 : Immunité humorale et cellulaire au cours de la toxoplasmose (Sharma, 1990)

N'éliminant pas les parasites de la primo-infection, elle correspond à une immunité non stérilisante dite immunité de prémunition.

Comme l'immunité à médiation humorale sera décrite au chapitre III, nous développerons ici uniquement la composante cellulaire de l'immunité spécifique

Un état d'hypersensibilité retardé vis-à-vis des antigènes du toxoplasme a été mis en évidence (Krahenbuhl *et al.*, 1971). Cette hypersensibilité décrite chez l'homme et chez de nombreux animaux apparaît plusieurs mois voire plusieurs années après l'infection initiale (Remington et Krahenbuhl, 1982). Chez l'homme, ce type de réponse peut être provoqué par un test cutané avec injection d'antigènes spécifiques du toxoplasme et reflète la présence d'une infection chronique tout en excluant une toxoplasmose aiguë. Une modification du test cutané utilisant des antigènes excrétés-sécrétés a permis d'en augmenter la spécificité et la sensibilité (Rougier et Ambroise-Thomas, 1985). La mise au point des tests de transformation lymphoblastique antigène spécifique chez les sujets chroniquement infectés a permis d'analyser et de quantifier la réponse lymphocytaire induite par le toxoplasme (Krahenbuhl *et al.*, 1972).

a) Rôle des lymphocytes T

Le transfert de cellules spléniques et ganglionnaires provenant de hamsters immuns et permettant de protéger significativement des hamsters sains syngéniques contre une infection létale par la souche virulente RH a permis de démontrer, pour la première fois, le rôle protecteur des lymphocytes T (Frenkel, 1967). Chez le cobaye infesté par le parasite, le transfert passif de lymphocytes T immuns syngéniques assure une protection partielle (Pavia, 1986). Des cobayes devenus beaucoup plus sensibles à l'infection par la souche RH après ablation du thymus et après irradiation ont retrouvé leur immunité anti-toxoplasme, après transfert de lymphocytes sains syngéniques (Pavia, 1987). Chez la souris infestée par une souche modérément virulente C56, on a obtenu une protection complète grâce au transfert de cellules spléniques provenant de souris immunisées par la souche mutante thermosensible ts-4 et une inhibition de la formation des kystes au niveau des cerveaux (Suzuki et Remington, 1988). Dans cette expérience, l'implication des lymphocytes T auxiliaires "helper" et T cytotoxiques a été démontrée.

Alors que le rat est naturellement résistant à l'infection par le toxoplasme, le rat athymique "nude" ne survit pas à l'infection. Par contre, le transfert de lymphocytes T de

rats euthymiques aux rats "nude" restaure, de façon dose dépendante, leur résistance à cette infection (Santoro *et al.*, 1987). Une greffe de cellules thymiques de souris à une souris "nude" apporte une immunité dirigée contre le parasite (Lindberg et Frenkel, 1977).

Chez l'homme, les lymphocytes T de certains patients en phase aigüe prolifèrent moins en réponse à l'antigène que des lymphocytes de patients en phase chronique (Luft *et al.*, 1984b). Une réponse proliférative importante dirigée contre l'antigène P22 a été observée chez des patients atteints de toxoplasmose oculaire (Nussenblatt *et al.*, 1989). Par contre, une absence totale de prolifération dirigée contre certains antigènes du parasite a été décrite dans des cas de toxoplasmose congénitale (McLeod *et al.*, 1985).

Une déplétion de lymphocytes CD4⁺ par un anticorps monoclonal (GK 1.5), chez des souris infectées, induit une réactivation de la toxoplasmose cérébrale (Volmer *et al.*, 1987). Par contre, les lymphocytes T CD8⁺ seraient impliqués dans la régulation du nombre de kystes (Brown et McLeod, 1990). Selon certains auteurs, l'immunité protectrice et l'inhibition de la formation des kystes seraient assurées chez la souris par les lymphocytes CD8⁺ (Parker *et al.*, 1991) quant aux lymphocytes CD4⁺, ils seraient responsables de la résistance de l'hôte mais interviendraient également dans le contrôle du nombre de kystes cérébraux (Araujo, 1991). Pour finir, une synergie existerait entre les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ (Gazzinelli *et al.*, 1991). En effet, après infection, un traitement par des anticorps anti-CD4⁺ et des anti-CD8⁺ inhibe complètement toute résistance à l'infection. Un traitement avec uniquement des anticorps anti-CD4⁺ ne réduit pas la protection. Seul un traitement anti-CD8⁺ réduit en partie la résistance à l'infection. C'est pourquoi les lymphocytes CD8⁺ représenteraient l'effecteur de l'immunité et les lymphocytes CD4⁺ le modulateur de la réponse CD8⁺ via la sécrétion de cytokines (interféron γ et interleukine 2).

Les lymphocytes T cytotoxiques CD8⁺ humains ou murins sont capables de lyser directement des toxoplasmes extracellulaires (Khan *et al.*, 1990). De même, ils sont impliqués dans la destruction de parasites intracellulaires (Kasper *et al.*, 1992). L'existence d'une réponse cytotoxique induite par les cellules T CD4⁺ a été démontrée chez l'homme (Denkers et Sher, 1997).

Chez les patients atteints de toxoplasmose aigüe, le nombre de cellules T $\gamma\delta$ augmente dans le sang périphérique (Kaufmann et Kabelitz, 1991). Ils agiraient en augmentant l'expression d'une "Heat shock protein" (Hsp65) à la surface et dans le cytoplasme des macrophages infectés par le parasite. Cette protéine agirait en inhibant

l'apoptose des cellules infectées par une souche avirulente. Les souches virulentes quant à elles inhibent l'expression de cette protéine (Hisaeda *et al.*, 1995 et 1997).

Des souris infectées (souche Me49) et déplétées à 30% en lymphocytes T $\gamma\delta$ (Thy-1⁺ CD4⁻ et CD8⁻) survivent sans traitement. Pendant la phase aigüe de la maladie, aucune augmentation de leur nombre n'est observée dans la rate ou dans la cavité péritonéale. Ces résultats indiquent que les cellules T $\gamma\delta$ ne semblent pas jouer un rôle important dans la défense de l'hôte murin (Sayles *et al.*, 1995). De plus, ces auteurs rapportent que des souris SCID immunodéprimées et dépourvues de lymphocytes T (dont les lymphocytes T $\gamma\delta$.) développent, lors d'une toxoplasmose aigüe, un mécanisme de résistance dépendant de l'INF- γ .

b) Les plaquettes

Des plaquettes obtenues à partir de rats infectés ou immunisés par les antigènes excrétés-sécrétés et présentant à leur surface des IgE sont capables, après transfert, de conférer une protection à des rats "nude" infectés par une dose létale de parasites (Ridel *et al.*, 1988). De même, en absence d'IgE mais via le thromboxane, les plaquettes humaines non immunes sont cytotoxiques par contact direct pour les tachyzoïtes (Yong *et al.*, 1991). Chez le rat, des plaquettes dérivées d'hôtes immuns sont également cytotoxiques (Ridel *et al.*, 1988).

C) Contribution des modèles animaux

Connaître les mécanismes responsables et les molécules impliquées dans la virulence des différentes souches de *Toxoplasma gondii* permettrait sur le plan clinique de mieux appréhender les thérapies à adopter face aux différentes formes de toxoplasmoses humaines. Pour répondre à ces questions, le modèle animal constitue un système expérimental de choix. Il représente un outil précieux et performant lorsqu'il constitue une réplique parfaite des processus pathologiques mis en oeuvre chez l'homme.

Les modèles animaux permettant l'étude de la toxoplasmose sont essentiellement réalisés à partir de rongeurs comme la souris, le rat et le cobaye. Ces animaux constituent des espèces de choix pour la recherche biomédicale (petite taille facilitant leur manipulation, anesthésie, étude d'organes,...).

Les études expérimentales de la toxoplasmose chez l'animal (Lapin, rat et souris) par amplification génique font également leur émergence (Hitt *et al.*, 1992 ; Joss *et al.*, 1993 et Weiss *et al.*, 1991).

Cependant, les modèles animaux présentent certaines limites d'utilisation. Les particularités de fonctionnement d'un système biologique de même que la spécificité biochimique liée au fonctionnement de certaines cellules, tissus ou organes font apparaître des limites physiologiques et métaboliques.

Les principaux modèles animaux de toxoplasmose

Les différents modèles expérimentaux de toxoplasmose peuvent être classés en fonction d'un volet pathologique étudié et de l'animal utilisé (Darcy et Zenner, 1993).

Cinq grands syndromes définissent les modèles expérimentaux de la toxoplasmose : aigüe, cérébrale, oculaire, congénitale et les modèles concernant la réactivation toxoplasmique lors d'une immunosuppression (réactivation des kystes cérébraux). Ces modèles sont le reflet des pathologies provoquées par le parasite, c'est à dire de toxoplasmose congénitale avec ses possibilités de prévention, de toxoplasmose oculaire, de toxoplasmose cérébrale et de toxoplasmose au cours du SIDA avec son aspect encéphalite et réactivation.

Les animaux de laboratoire peuvent être classés en deux groupes définis par leur résistance ou leur sensibilité à l'infection. Le rat et les singes de l'ancien monde appartiennent au groupe résistant alors que la souris, le hamster, le cobaye et les singes du nouveau monde appartiennent au groupe dit sensible. Bien que l'homme soit plus proche du groupe résistant, la souris reste le modèle expérimental le plus utilisé actuellement.

1) Modèles animaux de toxoplasmose acquise

Lors d'une toxoplasmose acquise, il se produit une dissémination du parasite à travers tout l'organisme accompagnée de lésions situées au niveau de nombreux organes (Jacobs 1956 et Fujii *et al.*, 1983). Suite à cette infection et selon les espèces animales, la maladie peut ou non provoquer la mort de l'animal.

Les lésions cérébrales et oculaires ont été étudiées dans différentes espèces. Les autres pathologies consistent en des aires multifocales de nécrose dans différents organes associant une pneumonie interstitielle diffuse. La toxoplasmose acquise a été également explorée chez des primates. Ainsi, l'infection des singes de l'ancien monde correspond à des formes inapparentes et à une hypertrophie des ganglions lymphatiques contrairement à celle des singes du nouveau monde qui produit des lésions graves, des nécroses, une pneumonie interstitielle et des aires de nécrose localisées dans différents organes (ganglions lymphatiques, poumon et foie) (Dubey et Beattie, 1988).

Après une infection létale chez la souris et le cobaye, des parasites ont été retrouvés dans différents organes comme les ganglions lymphatiques, le foie, les poumons, le cerveau, le coeur, la rate et le diaphragme mais également dans le tissu sanguin (Pavia, 1987). Une étude plus complète chez la souris (OF1) et le rat (Fischer F344, Figure 8), concernant 8 organes différents (ganglions mésentériques, rate, cerveau, poumons, coeur, foie, diaphragme et "sang") et s'échelonnant sur une période allant de la phase aigüe à la phase chronique, a permis de montrer les phénomènes pathologiques de base lors d'une infection (devenir du parasite, mode de multiplication selon les organes et lésions occasionnées) en étudiant de manière comparée le déroulement d'une infection selon les souches de *Toxoplasma gondii* (Rh et Prugniaud) (Zenner *et al.*, 1999). Cette étude montre, indépendamment de la souche parasitaire utilisée, que les différents organes sont infestés de manière non synchrone traduisant la progression de l'infection (dissémination par les ganglions mésentériques suivie par une dissémination par voie hématogène). De plus, chez le rat ou la souris, les lésions provoquées par la souche Prugniaud sont plus importantes que celles occasionnées par la souche virulente RH. Il est également observé, en phase chronique, des réactions inflammatoires au niveau des lésions cérébrales. Ces études tendent à prouver que l'utilisation du rat comme modèle expérimental est plus appropriée parce que le rat est naturellement résistant à l'infection et parce que les lésions produites sont similaires à celles décrites chez l'homme. Une analyse comparative de la cinétique de dissémination du parasite (souche RH ou Prugniaud) dans différents tissus ou organes de l'hôte (poumon, cerveau, rate, coeur, diaphragme, sang, foie et ganglions mésentériques) chez le rat et la souris confirme la résistance du rat vis-à-vis de la souche RH et l'effet morbide de celle-ci vis à vis de la souris (Zenner *et al.*, 1998).

Un modèle murin (BALB/cAnNHsd) de toxoplasmose pulmonaire (souche C56) a été proposé par Filice (Filice *et al.*, 1999). Il a montré qu'une réactivation de l'infection parasitaire (3 semaines après la phase aigüe) déclenche une pneumonie et qu'il est possible d'induire une seconde toxoplasmose pulmonaire par infection virale (CMV : CytoMegalovirus murin). Les souris au cours de la première infection

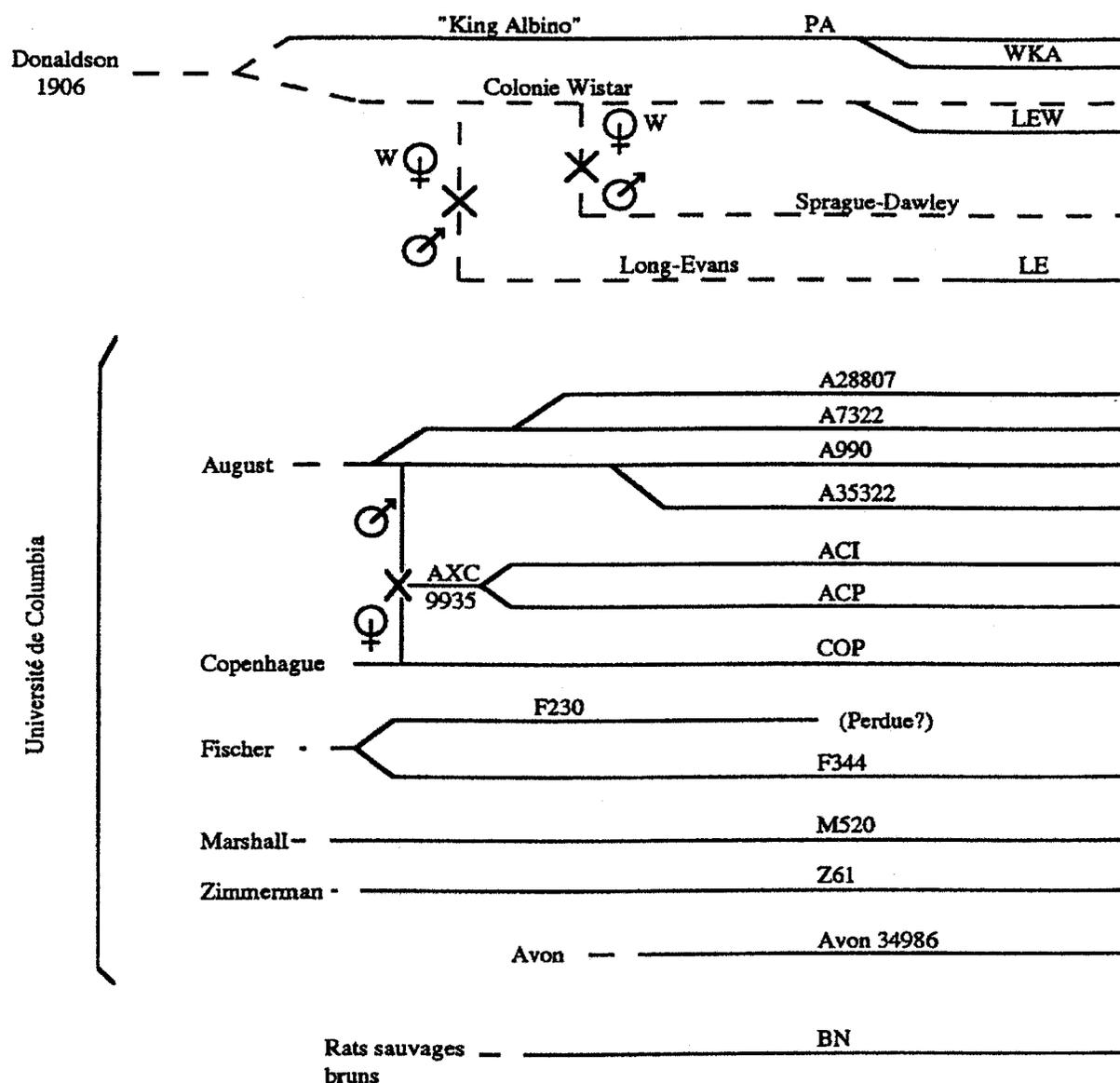


FIGURE 8 : Historique et généalogie des principales lignées de rats de laboratoire

- Légende :**
- : Lignée non consanguine
 - : Lignée consanguine
 - Donaldson** : Scientifique au Wistar Institut (Philadelphie, USA)
 - King Albino (ou PA)** : Lignée consanguine de rats albinos
 - Wistar** : Lignée non consanguine de Joseph Long et issue initialement d'un croisement "Femelle Wistar x Mâle sauvage de Berkeley"
 - Sprague-Dawley** : Lignée non consanguine de Robert W. dawley issue d'un croisement "Femelle Wistar x Mâle d'origine inconnue"
 - Auguste, Fischer, Marshall et Zimmerman** : Lignées consanguines de Curtis et Bullock (université de Columbia). Les noms des lignées correspondent aux noms des fournisseurs locaux
 - Copenhague** : Lignée consanguine. Rats importés de Copenhague en 1921
 - Avon** : Lignée consanguine. Rats importés d'Avon (Connecticut, USA)
 - BN (Brown Norway)** : Lignée de Silvers et Billingham (1958) et issue d'une colonie de rats bruns maintenus par King depuis 1930

pulmonaire sont maintenues en vie grâce à un traitement à la sulfadiazine. Pendant l'infection virale, il est observé dans les tissus pulmonaires, une diminution de l'IL-2 et une augmentation de l'IL-10. Par contre, durant la seconde toxoplasmose pulmonaire, il se produit une augmentation de l'INF γ , de l'IL-2, IL-4 et IL-10 dans les cellules des lavages broncho-alvéolaires et les tissus pulmonaires. Les auteurs concluent donc que ces deux formes de toxoplasmose pulmonaire s'accompagnent, au niveau des poumons, d'une production de cytokines d'origine lymphocytaire (lymphocytes T "helper" de type 1 et 2).

Un autre modèle de toxoplasmose pulmonaire chez la souris (BALB/c et NMRI), utilisant 3 souches différentes du parasite (virulente = RH, avirulente = GAIL et modérément virulente = NED, a permis de montrer que le degré d'infection, le nombre de parasites et la prolifération parasitaire dans les tissus pulmonaires dépendaient de la souche parasitaire et de la souris utilisées mais également de la voie d'infection empruntée (Sahm *et al.*, 1998).

2) Modèles animaux de toxoplasmose cérébrale

L'étude de la toxoplasme cérébrale a suscité un intérêt tout particulier depuis l'émergence de l'infection après contamination par le virus de l'immunodéficience humaine et cela parce que la toxoplasmose représente une des principales infections opportunistes chez les patients sidéens. La majorité de ces études a essentiellement utilisé la souris comme modèle expérimental. Chez une souris normale, l'inoculation intracérébrale s'accompagne de nécroses localisées au lieu d'injection avec présence de zones d'inflammation et formation de kystes (Hofflins *et al.*, 1987). L'inoculation sous-cutanée par une souche peu virulente induit la formation tardive de kystes (11 jours après l'inoculation) (Ferguson et Hutchison, 1987). Cependant, la pathogénèse de l'encéphalite toxoplasmique dépend de la souche de la souris et de celle du parasite qui sont utilisées (Suzuki *et al.*, 1989).

L'infection acquise du rat "nude" avec la souche Prugniaud semble constituer un modèle de toxoplasmose disséminée proche d'une primo-infection chez le sujet immunodéficient (Foulet *et al.*, 1994). Le rat utilisé dans cette étude correspond à une souche génétiquement athymique (nu/nu) développée à l'Institut Pasteur de Lille à partir de croisements de rats consanguins génétiquement athymiques Wistar et de Fischer F344. (Phillips *et al.*, 1983). Dans cette étude, les auteurs montrent que la phase d'enkystement semble indépendante de l'existence du système immunitaire (kystes cérébraux retrouvés 2 semaines après infection par la souche Prugniaud) et que les mécanismes permettant le contrôle des kystes semblent, quant à eux, nécessiter la présence d'un système immunitaire compétent. Ils observent également une évolution morphologique des kystes

et émettent l'hypothèse de "mini-cycles kystes-tachyzoïtes". Lors de ces mini-cycles, il existerait un équilibre dans la balance entre les deux formes parasitaires. La réactivation serait alors dûe à un manque de contrôle de la forme libre et une rupture de la balance entre ces deux formes.

3) Modèles animaux de toxoplasmose oculaire

Les modèles animaux généralement utilisés sont le lapin (Nozik et O'Connor, 1970) mais également le cobaye (Skorich *et al.*, 1988), la souris (Aoki *et al.*, 1970) et le singe (Holland *et al.*, 1988). Dans ces différents modèles, la maladie était étudiée après injection intraoculaire de tachyzoïtes.

4) Modèles animaux et toxoplasmose congénitale

La transmission du parasite *in utéro*, de la mère au fœtus peut s'effectuer selon différentes voies (Loke, 1982, Cowen et wolf, 1950 et Zenner *et al.*, 1991). Des modèles de toxoplasmose congénitale ont été décrits chez quatre espèces de rongeurs : cobaye (Wright, 1972), lapin (Uhlikova et Hubner, 1973), souris (Nakayama, 1968) et rat (Dubey et Shen, 1991).

Les études de toxoplasmose congénitale chez la souris ont conduit à des résultats contradictoires quant au mode de transmission et à l'immunité protectrice. En 1943, le seul mode décrit de transmission *in utero* du parasite est la transmission observée chez l'homme (Wolf *et al.*, 1939) et chez la souris (Weinman, 1943). Chez des souris non-consanguines au cours d'une toxoplasmose aigüe, la transmission du parasite peut s'effectuer aussi par le lait (Eichenwald, 1948). L'infection foetale par voie vaginale (Cowen et wolf, 1950) est démontrée à partir de souris gestantes non-consanguines infectées par les souches BD (Wolf *et al.*, 1939), LM (Paige *et al.*, 1939) et la souche TR isolée en 1944. Chez la souris ICR, un taux de transmission congénitale de 11% est obtenu avec la souche RH (Nakayama, 1968). Après connaissance du cycle complet du parasite en 1969, un taux de transmission de 5 à 16% chez la souris Swiss, avec des lésions histologiques des nouveaux-nés examinés à 9 semaines, a été décrit (Beverley et Henry, 1971). Un modèle de toxoplasmose congénitale chez la souris STR (Strathclyde Strain) non-consanguine utilisant la souche parasitaire Beverley permet des études sur la pathologie oculaire et cérébrale (Hutchison, 1986). Une tolérance au parasite par les anticorps maternels reçus lors de l'allaitement est démontrée chez la souris (Suzuki et Kobayashi, 1990).

La toxoplasmose congénitale chez le cobaye est beaucoup moins étudiée. L'infection des foetus est obtenue quelque soit le stade de gestation au cours duquel est réalisée l'infestation. De même, une mère infestée chroniquement transmet le parasite à sa portée (Huldt, 1960).

Chez le rat Sprague-Dawley et en utilisant la souche parasitaire CT-1, le taux de transmission est variable selon le mode de contamination. L'infection par des oocytes par voie sous-cutanée permet un taux de transmission de 82% alors que l'utilisation de kystes le fait chuter à 43% (Dubey et Khen, 1991). Chez le rat Fischer, le taux de transmission foetale lors d'une infection entre le 8^{ième} et le 12^{ième} jour de gestation est de 58,2% pour la souche RH, de 35,2% pour la souche 76K et de 62,8% pour la souche Prugniaud. Aucun foetus infecté n'a été détecté dans les portées provenant de rates infectées chroniquement par la souche RH ou Prugniaud (Zenner *et al.*, 1993). Ce modèle constitue un bon modèle expérimental de la toxoplasmose congénitale humaine.

5) Modèles animaux d'immunosuppression et réactivation toxoplasmique

La toxoplasmose chez les sujets immunodéficients a été étudiée chez le rat "nude" et la souris. Le rat "nude" génétiquement athymique ne survit pas à une infection de 1000 toxoplasmes de la souche RH alors que le rat euthymique est résistant à l'infection (Darcy et Zenner, 1993). La sensibilité de la souris "nude" a également été démontrée (Lindberg et Frenkel, 1977). Des différences histopathologiques entre une souris normale et une souris devenue immunodéficiente par traitements à l'acétate de cortisone, cyclophosphamide ou cyclosporine ont été décrites (Hofflin *et al.*, 1987).

Un traitement immunosuppresseur par la dexaméthasone permet, chez des souris "Porton" chroniquement infectées par l'isolat parasitaire M3, d'induire une recrudescence de l'infection. En plus de son effet immunosuppresseur, cette molécule présente également un effet anti-inflammatoire, ce qui favorise considérablement l'investigation de l'interaction hôte-parasite. Ce modèle d'étude chez la souris permet donc une approche expérimentale de réactivation toxoplasmique observée chez les patients atteints de SIDA (Nicoll *et al.*, 1997).

Des chats rendus immunodéficients après infection par le virus FIV (feline immunodeficiency virus) sont également très sensibles aux maladies opportunistes comme la toxoplasmose. Après infection par la souche avirulente Me49, l'immunodéficiency serait due à l'absence de production d'IL-2 et d'IL-12 au niveau des

ganglions lymphatiques périphériques. Par contre, l'augmentation significative d'IL-10 suggère que cette interleukine représente un bon marqueur de prédiction de l'infection par le virus (Levy *et al.*, 1998). Chez l'homme, des expériences *in vitro* ont montré qu'après stimulation par des antigènes solubles de *Toxoplasma gondii*, le surnageant de culture de globules blancs provenant de patients infectés par le parasite produit de l'IL-2, IL-12 et de l'INF- γ . Par contre, les cultures dont les cellules proviennent de patients co-infectés par le parasite et le virus, présentent une réponse IL-2, IL-12 et INF- γ fortement diminuée (Gazzinelli *et al.*, 1995). Ces différentes observations montrent que ce modèle d'immunosuppression chez le chat semble similaire à celui de l'homme en ce qui concerne l'expression des interleukines IL-2 et IL-12.

Le fait que seulement 30% des patients atteints de SIDA et présentant des anticorps dirigés contre le toxoplasme développent une encéphalite toxoplasmique (Luft et Remington, 1988) suggère une contribution possible du statut génétique de l'hôte. Des souris d'haplotype H-2^b/H-2^k contrairement aux souris d'haplotype H-2^a/H-2^d, développent d'importantes réactions inflammatoires au niveau cérébral lors d'une infection chronique par la souche Me49 (Suzuki *et al.*, 1991).

Une étude utilisant des souris consanguines B10 révèle qu'un gène situé dans la région H-2D contrôle le développement d'une encéphalite toxoplasmique (Suzuki et Remington, 1993).

Un gène de class I (L^d), localisé sur le chromosome 17 et appartenant à la région H-2, confère chez la souris BALB/c une résistance à l'infection parasitaire par voie orale, en limitant les risques d'une toxoplasmose cérébrale et en diminuant la charge kystique (souche Me49). Le produit du gène L^d pourrait, selon les auteurs, être régulé négativement par l'IL-10 (Brown *et al.*, 1995).

La nature de la souche elle-même peut être un facteur critique dans le développement d'une réponse inflammatoire cérébrale au cours d'une infection chronique. Chez la souris CBA/Ca (haplotype H-2^k), les deux souches parasitaires DAG et Me49 sont peu virulentes durant la phase aiguë de l'infection. Par contre, seule la souche Me49 induit une réaction inflammatoire importante au cours de la phase chronique de l'infection (Suzuki *et al.*, 1988b).

III) METHODES DE DETECTION DE L'INFECTION ET TRAITEMENT DE LA TOXOPLASMOSE

A) Méthodes de détection de l'infection

Grâce aux méthodes de détection de l'infection parasitaire, il est possible de déterminer, par une mise en évidence directe ou indirecte du parasite, si un organisme vivant est infecté ou non. Elles permettent également de connaître son degré d'infection en quantifiant la charge parasitaire infectante. Les méthodes non quantitatives font appel à la PCR, à l'inoculation à la souris et à la culture cellulaire (méthodes directes) ou à la sérologie (méthode indirecte) et comprennent également l'évaluation des signes prédictifs (radiologie et signes biologiques non spécifiques). Les méthodes de quantification de la charge parasitaire reposent quant à elles sur la PCR quantitative.

Le diagnostic de la toxoplasmose peut être établi avec certitude en cas de mise en évidence du parasite lors d'examen anatomique de biopsies, mais également grâce à l'isolement du toxoplasme après inoculation à des animaux de laboratoire. Cependant, ce diagnostic direct, souvent difficile et aléatoire, était toujours contraignant. Rechercher la présence du parasite lors d'examen anatomopathologique était souvent voué à l'échec.

Dans le cas de toxoplasmose congénitale ou évolutive chez les patients immunodéprimés, la présence du parasite est recherchée au microscope sur des prélèvements biologiques tels que le sang du cordon, le liquide amniotique, le placenta, le liquide céphalo-rachidien et les lavages broncho-alvéolaires. Cette recherche nécessite également l'utilisation de techniques d'inoculation de tissus infectés à des souris (Desmonts *et al.*, 1985) complétées par des techniques de culture cellulaire (Derouin *et al.*, 1987).

Le diagnostic de la toxoplasmose repose donc préférentiellement sur des méthodes sérologiques qui permettent de différencier une immunité de protection d'une séroconversion, d'une infection récente ou d'une toxoplasmose congénitale.

En absence de signes cliniques propres à une toxoplasmose aiguë, le diagnostic de toxoplasmose repose essentiellement sur la recherche d'anticorps anti-toxoplasme.

1) Diagnostic sérologique

a) Quelques rappels de l'immunité humorale humaine

Depuis ces dernières années, la recherche dans le domaine de l'immunologie appliquée à la toxoplasmose s'est intensifiée, probablement en raison de l'impact de la toxoplasmose comme maladie opportuniste chez les patients atteints de SIDA. L'infection par le toxoplasme induit une réponse immune à la fois humorale et cellulaire. L'importance relative de ces deux composantes dépend de la souche parasitaire et de l'espèce animale concernées. Cependant, il semblerait que se soit la réponse à médiation cellulaire qui joue un rôle prépondérant dans la résistance à l'infection. (Johnson, 1990b).

Les anticorps circulants représentent une première barrière de défense dirigée contre les tachyzoïtes extracellulaires. L'opsonisation du parasite facilite la phagocytose par les macrophages entraînant sa destruction (Sethi *et al.*, 1981 et Mordue et Sibley, 1997) et parallèlement amorce la lyse cellulaire de ce parasite via la voie du complément.

Le diagnostic de la toxoplasmose s'effectue le plus souvent à partir de la détection des anticorps spécifiques d'isotypes IgG et IgM. Chez l'homme, les IgM apparaissent à partir de la 2^{ème} semaine après l'infection, puis plus tardivement apparaissent les IgG. La production maximale de ces derniers survient 2 mois après l'infection. La quantité d'IgG décroît ensuite jusqu'à une valeur minimale qui persistera toute la vie. Les IgM diminuent rapidement en quelques semaines et par conséquent, leur présence est une caractéristique de la phase aiguë de la maladie. Cependant, ils peuvent persister plusieurs années (Desmont *et al.*, 1981 ; Le Fichoux *et al.*, 1984 et Santoro *et al.*, 1985) chez certains individus, ce qui complique dans ce cas, l'interprétation des résultats sérologiques.

Des IgE dirigées contre l'antigène majeur de surface P30 (Darcy *et al.*, 1992) apparaissent très précocément et permettent également d'estimer la date d'une séroconversion récente (Wong *et al.*, 1993 et Pinon *et al.*, 1990).

Chez l'homme, les IgA spécifiques contribuant à l'immunité mucoale (Chardès *et al.*, 1993) sont également détectées très précocément (Darcy *et al.*, 1991) puis disparaissent en 3 à 9 mois (Partanen *et al.*, 1984 et Huskinson *et al.*, 1990). Parce que reconnues précocément, les IgA dirigées contre la protéine P30 (SAG1) (Darcy *et al.*, 1991) constituent un bon marqueur de toxoplasmose aiguë.

Ainsi , la détection simultanée des IgA et IgM (Decoster *et al.*, 1988a et 1991) de même que celle des IgE témoigne d'une infection aigüe de la maladie et permet une meilleure évaluation du risque de toxoplasmose congénitale.

Pourtant, les tests sérologiques conventionnels semblent inadaptés pour diagnostiquer la maladie chez l'enfant *in utero* voire chez le nouveau-né. En effet, il est impossible de distinguer les IgG spécifiques de l'enfant de celles de la mère qui auraient traversé le placenta. Cependant et parce qu'elles ne traversent pas le placenta, la réponse spécifique des nouveau-nés peut être révélée par la présence d'IgM et d'IgA. Ces anticorps peuvent être détectés chez le fœtus infecté dès le 2^{ème} trimestre de la grossesse témoignant vraisemblablement d'une infection maternelle très précoce (Decoster *et al.*, 1992).

b) Description des techniques sérologiques

La diversité des structures antigéniques du toxoplasme est une raison expliquant la multitude des techniques fondées sur la détection d'anticorps spécifiques. Leur apport diagnostique est certain mais il est nécessaire d'en connaître leurs caractéristiques propres avant toute interprétation.

Ces techniques permettent soit de détecter et de quantifier des anticorps dirigés contre les antigènes de surface du parasite entier ou dirigés contre l'ensemble des antigènes à partir d'antigènes solubilisés (tests d'agglutination conditionnée), soit de détecter des IgM ou des IgA spécifiques du parasite.

- Le Dye-test ou test de lyse de Sabin et Feldman

Ce test (Sabin et Feldman, 1948) a pour principe d'exposer des toxoplasmes vivants en présence de complément et de sérum décomplémenté. La présence d'anticorps spécifiques entraîne la lyse des parasites par un mécanisme de cytotoxicité complément-dépendant (Capron *et al.*, 1974). Le titre correspond à la plus grande dilution qui lyse 50% des tachyzoïtes. Le résultat est exprimé par comparaison avec le sérum-étalon de l'OMS, en unité internationale d'immunoglobuline spécifiques par millilitre (U/mL). Cette technique de référence dosant les IgG et IgM antitoxoplasmique est une technique de choix de par sa sensibilité (2 UI/mL) et sa spécificité.

- L'immunofluorescence indirecte (IFI)

La réaction antigène-anticorps s'effectue sur des lames siliconées où ont été fixés des toxoplasmes. Après addition d'un conjugué fluorescent anti-IgG (Walton *et al.*, 1966) ou anti-IgM (Remington *et al.*, 1968), la visualisation de la réaction s'effectue au microscope par observation des parasites fluorescents en contact avec les différentes dilutions de sérums testés. Sa sensibilité est variable selon l'anti-immunoglobuline utilisée (70 à 20 UI/mL) mais dépend également de la qualité de la préparation de l'antigène.

- L'agglutination directe

Des toxoplasmes formolés, mis en présence des sérums sont agglutinés uniquement en présence d'anticorps spécifiques. Cette méthode est peu sensible (20 UI/mL) et peu spécifique dûe à un problème d'interférence avec les IgM naturels (Desmont *et al.*, 1974).

- L'agglutination directe sensibilisée (ADS)

Elle dérive de la technique précédente mais comporte en plus un traitement des sérums par le β -mercaptoéthanol qui, en dissociant les IgM, supprime leur interférence avec les IgM non spécifiques et assure une bonne sensibilité en raison également de la formolisation de l'antigène (2 UI/mL). L'ADS permet ainsi une détection précoce des IgG spécifiques.

- La réaction d'agglutination indirecte

Dans cette méthode, des globules rouges (Jacobs et Lunde, 1957) recouverts d'antigènes de toxoplasme sont incubés avec différentes dilutions de sérum avant et après traitement au β -mercaptoéthanol. Les sérums positifs conduisent à une hémagglutination. Les globules rouges sont parfois remplacés par des particules de latex. Cette méthode est peu sensible (10-40 UI/mL) et présente des risques de faux positifs (dûs aux anticorps naturels).

- Les réactions immunoenzymatiques indirectes (ELISA)

L'ELISA (Enzyme linked immunosorbend assay) (Seguela *et al.*, 1976) consiste à mettre en contact le sérum dilué avec des antigènes plus ou moins purifiés et fixés à un support solide (plaques de titration, tubes ou billes). La révélation des anticorps spécifiques se fait par une antiglobuline anti-IgG ou anti-IgM couplée à un enzyme. La transformation du substrat chromogène permet une lecture au spectrophotomètre. Selon l'antigène utilisé, la sensibilité (4 à 12 UI/mL) et la spécificité sont variables.

En ce qui concerne les IgM, cette technique n'exclut pas la possibilité de faux positifs dus aux auto-anticorps mais également au facteur rhumatoïde. Ces problèmes ont été en partie résolus par une meilleure purification des antigènes et une absorption préalable du facteur rhumatoïde.

- L'immunofiltration (ELIFA)

L'immunofiltration ou ELIFA (Enzyme Linked Immuno Filtration Assay) (Pinon *et al.*, 1985) correspond à une immunoélectrodifusion sur acétate de cellulose mettant en présence antigènes solubilisés et sérum suivie d'une immunofiltration avec des anticorps monospécifiques couplés à un enzyme (anti-IgG, IgM, IgA ou IgE). Elle permet de différencier les anticorps IgG, IgM, IgA et IgE et présente un intérêt certain pour le diagnostic de la toxoplasmose congénitale par comparaison dès la naissance des profils immunologiques du sang de la mère et du nouveau-né (Pinon *et al.*, 1985 et Pinon *et al.*, 1987)

- Le test de Remington

Ce test (Remington *et al.*, 1968) consiste en une immunofluorescence indirecte où le révélateur de l'anticorps fixé sur le parasite, est un conjugué à la fluorescéine anti-IgM. Cette technique est peu sensible. De plus, elle est source de faux positifs (anticorps naturels) et de faux négatifs.

- Les réactions immunoenzymatiques par technique reverse

Cette méthode également appelée immunocapture permet une séparation préalable des IgM ou d'autres isotypes (IgA et IgE) puis la révélation des seules IgM spécifiques.

La détection des IgM sériques se fait sur le principe de capture de ces anticorps par des globulines anti-IgM fixées sur un support solide (plaques de titration, billes et cônes). La fraction des IgM spécifiques antitoxoplasmes est révélée par différentes méthodes. La révélation par ELISA double sandwich se fait par l'intermédiaire d'un couple antigène toxoplasme soluble et anticorps antitoxoplasme associé à un enzyme. L'ELISA reverse se fait quant à elle par un antigène toxoplasmique soluble directement marqué par un enzyme. Ces techniques permettent d'éliminer le phénomène de compétition avec les IgG. Cependant, l'ELISA double sandwich peut présenter des interférences pour le facteur rhumatoïde. Ce problème peut être minimisé par une absorption préalable de ce facteur.

Un test d'immunocapture permettant de détecter les IgA dirigées contre l'antigène majeur de surface P30 permet de déceler ces anticorps spécifiques au cours de la phase aiguë de la toxoplasmose acquise (de 1 à 6 mois après l'infection) et, dans le cas de la toxoplasmose congénitale, uniquement chez les enfants contaminés par le parasite pendant la grossesse de la mère (Decoster *et al.*, 1988a).

- L'adsorption reverse (ISAgA)

L'ISAgA (Immunosorbent agglutination assay) (Desmonts, 1972) est une immunocapture des IgM, IgA ou IgE totales au moyen d'anticorps appropriés (anti-anticorps) fixés sur un support solide (plaque de titration) suivie de l'adsorption d'une suspension de tachyzoïtes. La présence des anticorps spécifiques est révélée par le voile formé par l'adsorption des parasites sur la paroi des cupules. Le résultat est exprimé en indice variant de 0 à 12.

L'ISAgA-IgM ne présente pas de problème d'interférence avec le facteur rhumatoïde et permet également d'éliminer le phénomène de compétition avec les IgG. Ces tests sont particulièrement adaptés au diagnostic de la toxoplasmose congénitale.

Les IgM peuvent persister pendant plusieurs années après l'infection par *Toxoplasma gondii* (Pujol *et al.*, 1989). Actuellement, la recherche des anticorps IgA et IgE spécifiques apparaissant aussi précocément que les IgM (mais qui disparaissent souvent avant les IgM) semble pouvoir apporter des indications diagnostiques supplémentaires (Pinon *et al.*, 1990 et Pujol *et al.*, 1989).

La recherche des antigènes parasitaires circulants dont la NTPase parasitaire (Asai *et al.*, 1987) peut aussi être d'un intérêt diagnostique considérable chez les patients

immunodéprimés. Ces antigènes sont effectivement détectables avant l'apparition des anticorps spécifiques et leur présence est indépendante des capacités immunitaires de l'individu (Candofi *et al.*, 1987).

2) Diagnostic direct du parasite

La mise en évidence du parasite dans les tissus ou les liquides biologiques reste une preuve irréfutable de l'infection toxoplasmique. Généralement, la recherche du parasite fait appel à l'inoculation de tissus infectés à des souris (Desmonts *et al.*, 1985) ou à des cultures cellulaires (Derouin *et al.*, 1987) et nécessite des techniques longues et laborieuses. Or, tout diagnostic de la toxoplasmose doit impérativement se faire par une technique rapide compte tenu de la rapidité d'évolution de certaines situations cliniques non traitées.

Grâce aux apports de la biologie moléculaire, une nouvelle génération de diagnostics basés sur l'amplification génique (PCR : Polymerase Chain Reaction) a fait son apparition. Cette technique, rapide d'exécution, est prometteuse dans le cas de la détection d'une toxoplasmose chez les sujets immunodéprimés pour lesquels la sérologie classique est inexploitable mais également en situation de toxoplasmose congénitale.

a) L'inoculation à la souris

L'inoculation s'effectue par injection intrapéritonéale de prélèvements biologiques (culots de centrifugation de sang du cordon ou de lavages broncho-alvéolaires, de liquide amniotique, de liquide céphalo-rachidien, de placenta trypsinisé, de broyat de tissus homogénéisés, ...). Une surveillance sérologique des souris est réalisée pendant 2 à 6 semaines après l'inoculation, et lorsque des anticorps antitoxoplasme sont détectés, une recherche de kystes intracérébraux est alors effectuée. Les résultats sont obtenus au bout de 4 à 6 semaines.

b) La culture cellulaire

L'inoculation de prélèvements biologiques (culots de centrifugation de sang du cordon, liquide amniotique, liquide céphalorachidien, ...) à des cultures cellulaires (fibroblastes MRC5, ...) permet après 4 à 7 jours, de mettre en évidence la présence du parasite. Ainsi, à partir d'un prélèvement de la culture, le parasite est visualisé après

coloration (May Grunwald Giemsa, hémalunéosine, ...) ou après immunomarquage (immunofluorescence directe, immunoperoxydase, ...).

Cette technique est contraignante de par l'entretien de la culture cellulaire elle-même. Sa sensibilité en comparaison à celle de l'inoculation à l'animal est variable selon les auteurs (Berrebi *et al.*, 1989 et Derouin *et al.*, 1988).

En cas de toxoplasmose congénitale, le traitement maternel peut être responsable de la mort du parasite lors de sa mise en culture et peut conduire à des résultats négatifs.

c) La détection par amplification génique (PCR)

Le diagnostic par hybridation moléculaire (Pelloux *et al.*, 1993) à l'aide de sondes nucléiques (ADN ou ARN monocaténaire) représente un progrès considérable dans les techniques de diagnostic puisqu'il permet d'aller chercher l'information génétique directement au coeur de la cellule ou de l'agent infectieux que l'on cherche à mettre en évidence. Ainsi, grâce à une sonde ADN (pJMBG 37) radiomarquée, il a été possible de détecter 20 ng d'ADN génomique de *Toxoplasma gondii*, équivalent à $1,5 \cdot 10^4$ tachyzoïtes (Ambroise -Thomas, 1990).

Une plus grande sensibilité a été obtenue par la technique d'amplification génique appelée également PCR (Polymerase Chain Reaction). La PCR correspond à une amplification enzymatique *in vitro* de l'ADN parasitaire cible.

Principe de la PCR (Figure 9)

La technique PCR conçue par Kary Mullis et Henri A. Herlich en 1985 permet pour la première fois l'amplification sélective *in vitro* d'une séquence d'ADN correspondant au gène β -globuline (Saiki *et al.*, 1985). La PCR (Figure 9 A) est dérivée de la technique dite "d'extension d'amorce" au cours de laquelle de courtes séquences d'ADN oligonucléotidiques sont utilisées comme amorces par un enzyme de réplication de l'ADN, l'ADN polymérase.

Cette extension d'amorce s'effectue en même temps sur les deux brins d'ADN. Pour cela, les deux oligonucléotides sont choisis pour être chacun complémentaire d'un des brins d'ADN. Ils sont positionnés de part et d'autre de la région d'intérêt pour que le produit d'extension par l'ADN polymérase de l'un des oligonucléotides puisse servir de

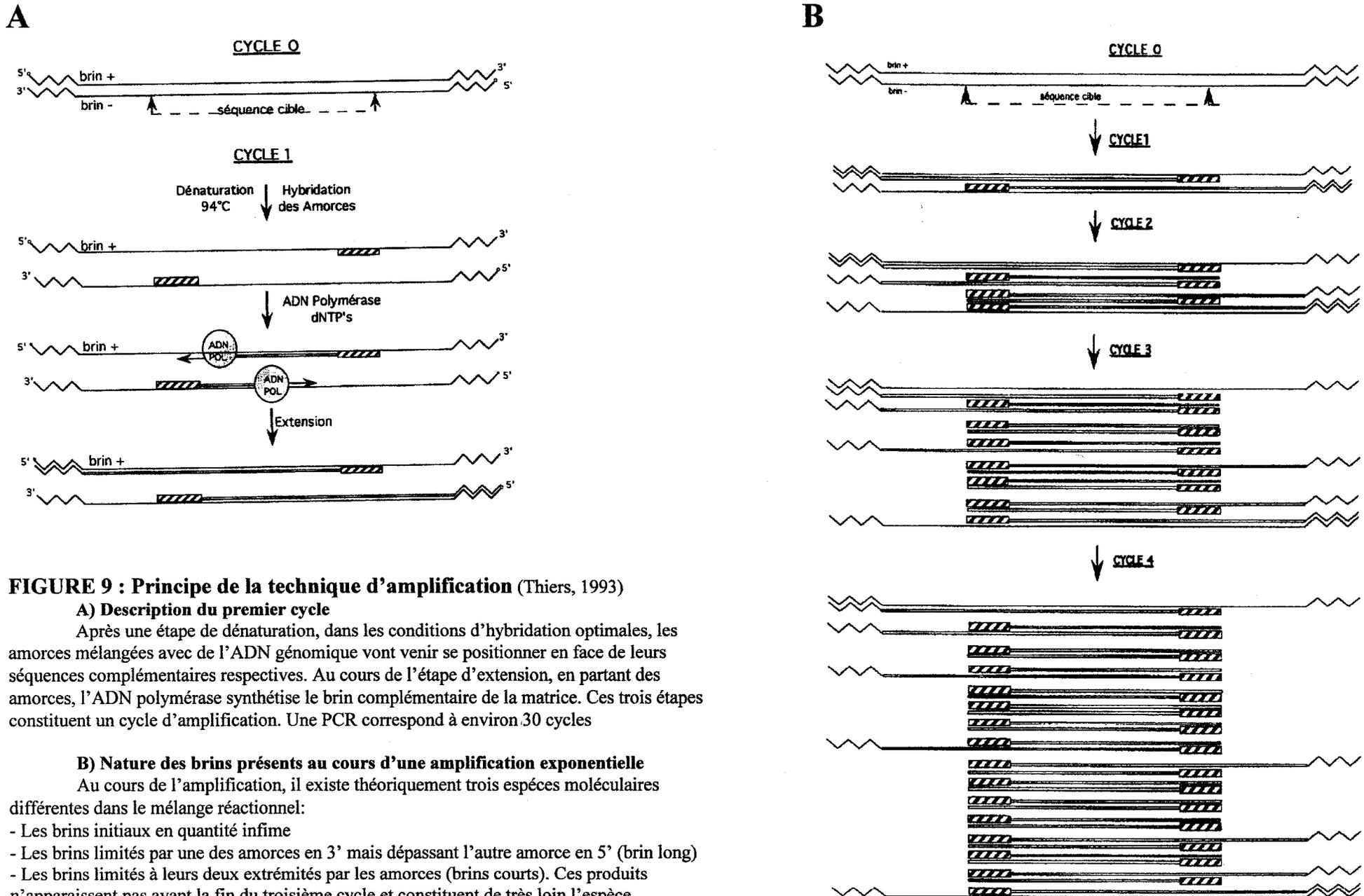


FIGURE 9 : Principe de la technique d'amplification (Thiers, 1993)

A) Description du premier cycle

Après une étape de dénaturation, dans les conditions d'hybridation optimales, les amorces mélangées avec de l'ADN génomique vont venir se positionner en face de leurs séquences complémentaires respectives. Au cours de l'étape d'extension, en partant des amorces, l'ADN polymérase synthétise le brin complémentaire de la matrice. Ces trois étapes constituent un cycle d'amplification. Une PCR correspond à environ 30 cycles

B) Nature des brins présents au cours d'une amplification exponentielle

Au cours de l'amplification, il existe théoriquement trois espèces moléculaires différentes dans le mélange réactionnel:

- Les brins initiaux en quantité infime
- Les brins limités par une des amorces en 3' mais dépassant l'autre amorce en 5' (brin long)
- Les brins limités à leurs deux extrémités par les amorces (brins courts). Ces produits n'apparaissent pas avant la fin du troisième cycle et constituent de très loin l'espèce majoritaire en fin de PCR.

matrice (une fois dénaturé) à l'autre et inversement. Après séparation des deux brins d'ADN, les amorces se fixent sur le brin d'ADN matrice dont elles sont complémentaires et vont orienter la synthèse. Cette synthèse, ayant lieu de façon simultanée sur chacun des deux brins, aboutit à la duplication de la séquence matrice initiale. Les produits d'amplification néosynthétisés vont à leur tour, après dénaturation, devenir des matrices et fixer les amorces dans les zones de complémentarité. Une réaction en chaîne s'établit par la répétition des cycles de "dénaturation-hybridation-extension" et se traduira par une accumulation exponentielle du fragment d'ADN cible (Figure 9 B).

La découverte d'une ADN polymérase thermostable, la "Taq polymérase" (Chien *et al.*, 1976) a permis d'automatiser la technique PCR car l'utilisation du fragment de Klenow comme ADN polymérase, nécessitait d'ajouter manuellement l'enzyme après chaque étape de chauffage (dénaturation) (Saiki *et al.*, 1988 et Erlich *et al.*, 1988).

- Détection du toxoplasme par PCR

Les premiers résultats réalisés à partir d'ADN génomique purifié démontrent l'extrême sensibilité des tests par PCR. En utilisant comme séquence-cible le gène B1 répété 35 fois par génome, il était possible de détecter après hybridation un toxoplasme préalablement isolé par FACS puis lysé (Burg *et al.*, 1989). En utilisant la même cible génomique (Van De Ven *et al.*, 1991), 15 fg d'ADN génomique purifié de toxoplasme (soit l'équivalent de 0,15 tachyzoïtes) se sont avérés positifs après hybridation. Une expérience comparable à l'aide du gène P30 (Savva *et al.*, 1990) a permis de détecter 0,5 pg d'ADN génomique (environ 5 toxoplasmes) après hybridation. Ces auteurs ont cependant amélioré la limite de détection à 0,05 pg en effectuant une PCR supplémentaire qui utilise comme matrice un dixième du produit PCR issu de la première amplification. En utilisant comme séquence-cible un fragment du gène d'ARNr 18S répété 110 fois par génome, 50 fg ont été détectés (soit 0,5 toxoplasme) sur gel d'électrophorèse. Cette sensibilité est augmentée d'un facteur 100 à 1000 lorsque les produits PCR sont détectés après hybridation sur Southern-blot. Enfin, à partir d'une autre séquence répétée pTGR1E (Cristina *et al.*, 1991), la sensibilité a également été de 0,05 pg (soit la moitié de la quantité d'ADN d'un toxoplasme) sur gel d'électrophorèse en présence de bromure d'éthidium et de 0,0001 pg (1/1000^e de toxoplasme) après hybridation.

Quelques soient les études effectuées, toutes permettent d'envisager une détection d'au moins un tachyzoïte. Cependant, ces différents travaux montrent une baisse significative de sensibilité consécutive à une augmentation importante dans le mélange

réactionnel d'une quantité d'ADN génomique humain. Ainsi, à l'aide du gène B1, on ne détecte plus que 10 tachyzoïtes au lieu de 1 tachyzoïte lorsque ceux-ci sont, au préalable, mélangés à 10^5 leucocytes ; de même, à partir du gène *SAG1*, seul 1 pg est détecté (au lieu de 0,5 pg) lorsque l'ADN génomique purifié est mélangé à de l'ADN humain équivalent à $1,5 \cdot 10^6$ cellules (Savva *et al.*, 1990). Après hybridation, 0,2 parasites au lieu de 0,0001 tachyzoïte (valeur déterminée à partir d'une gamme correspondant à de l'ADN génomique purifié) permettent d'obtenir un signal positif lorsque des suspensions de toxoplasmes sont mélangées à un équivalent de $2 \cdot 10^5$ lymphocytes humains (Christina *et al.*, 1992).

Le rendement d'amplification est, en réalité, diminué non pas par un excès d'ADN génomique humain ou de toxoplasme lui-même (Joss *et al.*, 1993) mais surtout en raison des débris cellulaires qui contaminent les préparations d'ADN. Les réactions d'amplification peuvent être également inhibées par des inhibiteurs spécifiques de la Taq polymérase et tout particulièrement par la molécule d'hème que l'on retrouve dans les préparations d'ADN issu de prélèvements sanguins (Weiss *et al.*, 19991 et Joss *et al.*, 1993).

La sensibilité et la spécificité de ces tests PCR appliquées au diagnostic de la toxoplasmose ayant été déterminées et contrôlées, de nombreuses études cliniques en ont bénéficié. Globalement, que ce soit dans le cas de toxoplasmoses congénitales ou chez des sujets immunodéprimés et à partir de divers prélèvements biologiques (sang du cordon, liquide amniotique, liquide céphalorachidien, sang veineux, lavage broncho-alvéolaire, humeurs aqueuses), la sensibilité et la spécificité de la PCR ont souvent été comparées à celles de méthodes de diagnostic beaucoup plus conventionnelles (inoculation à l'animal, culture cellulaire et tests sérologiques). D'autres critères de suspicion (imagerie) ou des marqueurs non spécifiques (taux des éosinophiles et des plaquettes, activité de la gamma glutamyl transférase, thrombopénie...) ont également fait l'objet de comparaisons. Il a ainsi été démontré la supériorité de la PCR en terme de sensibilité (atteignent 100% dans certaines études) (Guy *et al.*, 1995 ; Dupouy-Camet *et al.*, 1990, 1992 et 1993b ; Lebech *et al.*, 1992 ; Schoondermark-van de Ven *et al.*, 1991 et 1993 ; Parmley *et al.*, 1992 ; Filice *et al.*, 1993 ; Grover *et al.*, 1990 ; Guay *et al.*, 1993 ; Gross *et al.*, 1992 ; Hohlfeld *et al.*, 1994 ; Cazenave *et al.*, 1992a, 1992b ; Brézin *et al.*, 1991 ; Aouizerate *et al.*, 1991 ; Cristina *et al.*, 1992 ; Holliman *et al.*, 1990 et Savva et Holliman, 1991). Un seuil de 30% seulement de sensibilité a été observé dans une étude correspondant à une recherche du parasite dans l'humeur aqueuse de patients atteints de toxoplasmose oculaire. Ce pourcentage s'explique par la difficulté à obtenir une quantité de prélèvement suffisante et nécessaire pour l'analyse.

En règle générale, le pourcentage de détection est d'autant plus important que le gène cible est répété (Wastling *et al.*, 1993). Certains faux négatifs ont été décrits dans le cas de liquides amniotiques. Ils peuvent s'expliquer par l'absence du parasite dans l'échantillon testé puisque la quantité de liquide amniotique analysé correspondait à un aliquot d'un prélèvement par ailleurs inoculé aux cultures ou aux souris. Les faux positifs sont généralement évités grâce aux précautions d'usage appliquées à la PCR (Kwok et Higuchi, 1989). En revanche, les liquides amniotiques détectés positifs par PCR et négatifs par les autres techniques pourraient être dûs à la détection de toxoplasmes tués ou altérés par l'antibiotique systématiquement prescrit à la femme enceinte dès la suspicion de toxoplasmose congénitale. Ces parasites seraient incapables d'infecter le fœtus et les cultures cellulaires. La suspicion de toxoplasmose oculaire mais aussi de toxoplasmose lymphadénopathique a été confirmée grâce à des PCR réalisées sur des tissus préalablement conservés dans des blocs de parafine (Weiss *et al.* 1992 et Brézin *et al.*, 1990).

D'autres cibles génomiques ont également été décrites mais sont peu utilisées dans les études cliniques (Blanco *et al.*, 1992 et Xia *et al.*, 1992). Pourtant, les travaux de Xia permettaient de détecter 100 tachyzoïtes par Dot blot sans étape de PCR, ce qui laisse supposer l'existence d'un gène hautement répété. De même, les travaux de Blanco ont permis de cloner 3 fragments d'ADN génomique de *Toxoplasma gondii* dont le nombre de répétition est estimé à environ 1000, 200 et 40 copies selon le fragment considéré.

L'application de la PCR en diagnostic anténatal de toxoplasmose permet de réduire les délais de réponse et d'orienter la décision thérapeutique plus précocément. De même, son utilisation pour rechercher le parasite dans divers prélèvements biopsiques chez les sujets immunodéprimés s'avère être une alternative intéressante en cas d'inefficacité des diagnostics sérologiques.

[- Utilisation de la PCR pour quantifier le degré d'infection

La PCR a permis d'accroître à la fois la sensibilité et la spécificité de l'analyse des acides nucléiques. Outil fondamental de la biologie moléculaire, son usage s'est considérablement étendu à de nombreuses applications. Cependant, l'un des problèmes majeurs de la PCR est que la quantité de produits obtenus lors d'une PCR n'est pas corrélée à la quantité de matrice soumise initialement à l'amplification. En effet, l'amplification n'est exponentielle que lorsque la concentration en matrice est faible. Au bout d'un grand nombre de cycles, il se produit une accumulation d'une quantité importante de matrice qui provoque une diminution de l'efficacité de l'amplification

aboutissant à un effet plateau. L'hybridation des brins d'ADN complémentaires de la matrice entre en compétition avec la réaction d'hybridation de l'amorce. (Sylvänen *et al.*, 1988). Pour éviter ce problème de plateau, des procédés d'analyse quantitative focalisée sur la phase exponentielle de l'amplification ont été développés.

Ainsi et sous certaines conditions, la PCR quantitative permet réellement de relier la quantité d'ADN produite par amplification à la quantité présente initialement dans le milieu réactionnel. Toutefois, la grande sensibilité de la PCR permettant d'envisager le dosage de très faibles quantités d'ADN engendre d'autres problèmes. En effet, de faibles variations des conditions expérimentales (inhibiteurs de l'ADN polymérase présents dans les échantillons, différences de température du bloc chauffant, ...) provoquent de faibles variations du rendement de l'amplification à chaque cycle qui se traduisent par de grandes fluctuations de la quantité finale d'ADN produite. Il y a donc un problème de reproductibilité et d'étalonnage de ces dosages.

Il est possible d'évaluer des différences dans l'efficacité de la PCR d'un échantillon à l'autre par la co-amplification d'une séquence d'acide nucléique témoin au cours de la réaction. Le résultat de l'analyse donne une évaluation de la quantité relative de matrice par rapport au standard. La valeur réelle de matrice est alors calculée à partir d'une courbe normalisée.

Appliquée à la toxoplasmose, la PCR quantitative est potentiellement très utile pour quantifier une charge parasitaire intrakystique et permettre ainsi de suivre l'efficacité d'un traitement en phase d'expérimentation animale, par exemple pour évaluer une diminution significative (voire l'élimination complète) du nombre de kystes infectant les tissus cérébraux. La technique de PCR quantitative peut donc s'appliquer dans le cadre du développement de modèles animaux capables de reproduire l'équivalent de la toxoplasmose cérébrale humaine. Elle peut ainsi aider la recherche de nouvelles voies thérapeutiques destinées aux sujets immunodéprimés.]

a) Données actuelles de la PCR quantitative sur ADN

- Les différentes stratégies de construction d'une molécule standard

Les différentes méthodes de quantification sur ADN sont fondées sur l'utilisation d'un standard, le plus souvent interne, correspondant à une molécule d'ADN synthétisée *in vitro* et amplifiée avec les mêmes amorces que l'ADN étudié.

Un standard dit "interne" correspond à des molécules d'ADN présentes en quantité connue dans tous les mélanges réactionnels (Peccoud, 1993). Elles introduisent une compétition entre l'ADN cible et ce standard dont on fait varier la dose. On peut également utiliser comme standard interne une séquence unique ou un ARN messenger correspondant à un gène dit "de ménage"(house keeping gene) (Kellogg *et al.*, 1990 et Chelly *et al.*, 1988).

Un standard dit "externe" correspond à des molécules d'ADN identiques à l'ADN cible étudié dont la quantité est connue et amplifiée dans des tubes séparés d'une même série (Peccoud, 1993). Ce type de standard nécessite une plus grande maîtrise des variations dûes aux différences d'efficacité de l'ADN polymérase. De plus, en absence de contrôle interne dans le mélange réactionnel, les échantillons sont réalisés en double ou en triple exemplaires.

Il existe différents modes opératoires pour construire une molécule standard à partir d'une séquence d'ADN connu. La première consiste à créer par mutagenèse dirigée et par modification d'une seule base un nouveau site de restriction dans la molécule-cible (Becker *et al.*, 1989). La molécule standard et la cible génomique sont alors quasi-identiques à une base près en terme de longueur et de séquence. Après amplification, la molécule standard est digérée par l'enzyme de restriction correspondant au site créé afin de permettre, sur gel électrophorétique, sa séparation physique par rapport à la molécule cible.

D'autres auteurs ont inséré un fragment de quelques paires de bases au niveau d'un site de restriction présent dans la molécule cible (Li *et al.*, 1991). Cette insertion doit être suffisante en longueur pour permettre de séparer les fragments amplifiés sur gel d'agarose. Une approche comparable a permis d'insérer la séquence LacI du represseur de l'opéron lactose d'*Echerichia coli*. Cette molécule standard était ensuite non pas séparée sur gel d'électrophorèse mais fixée non covalamment sur un support solide pour y être reconnue par une protéine de fusion "LacI-represseur- β -galactosidase" (Lundeberg *et al.*, 1991).

La haute résolution de l'analyseur automatique d'ADN (en combinaison avec des amorces fluorescentes) permet la discrimination entre un standard et une cible dont la taille est différente de 4 paires de bases (Porcher *et al.*, 1992). Les deux extrémités cohésives simple brin 3' sortant obtenues, après coupure par l'enzyme de restriction, sont transformées en extrémités double brin bout franc. Après ligation de ces extrémités modifiées, on obtient une insertion de 3 à 4 paires de base selon l'enzyme de restriction utilisé (Pannetier *et al.*, 1993).

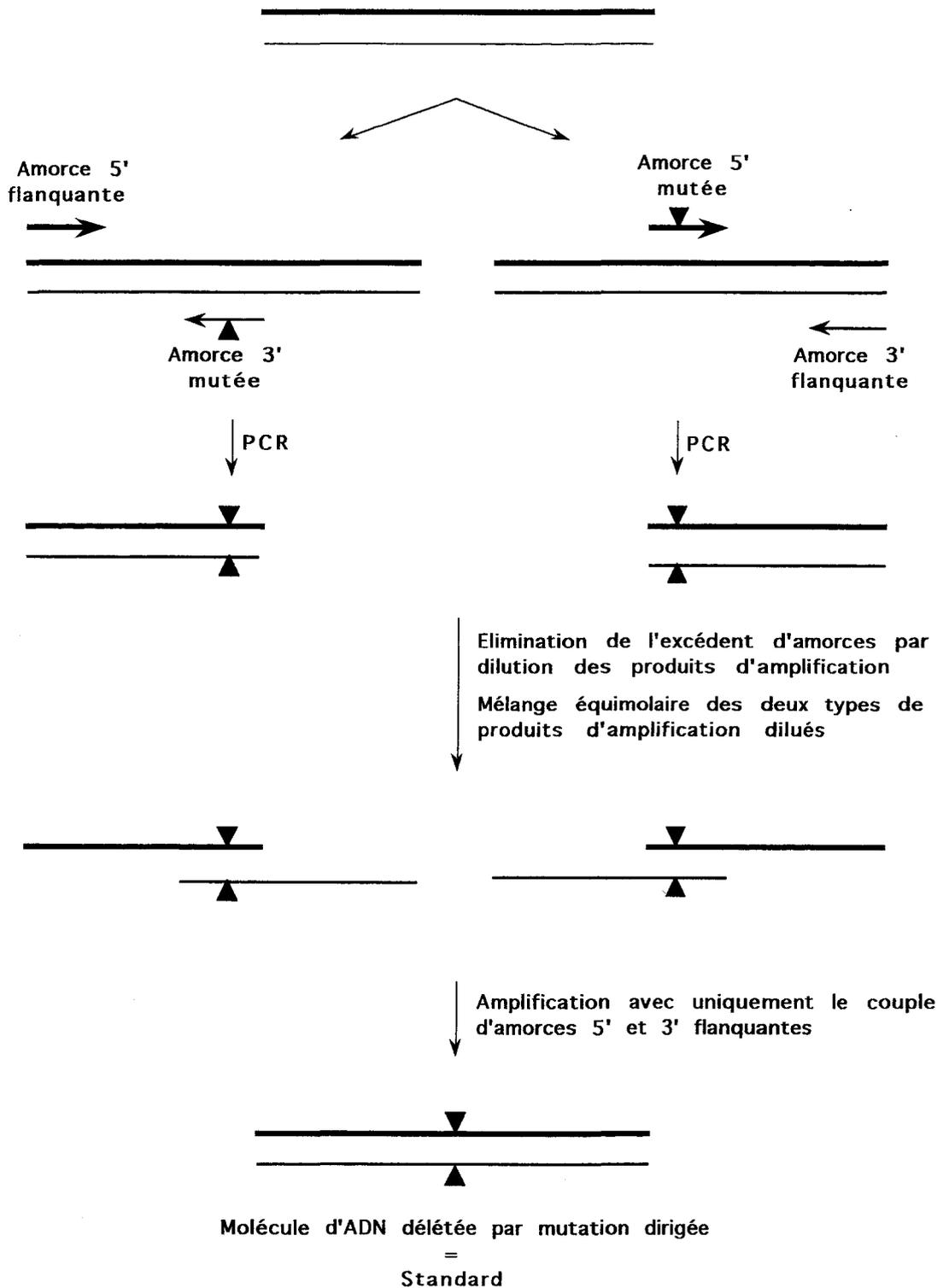
Selon une autre méthode (Figure 10), il est possible de construire le standard par délétion de quelques paires de bases en utilisant une stratégie PCR et l'emploi de deux couples d'amorces particuliers (Perrin et Gilliland, 1990). Le premier couple comprend l'amorce 5' dite "flanquante" qui s'hybride avec la région 5' de la molécule-cible et l'amorce 3' dite "mutée" qui chevauche la région à modifier par délétion et possède une délétion de 4 paires de bases en son centre. Une deuxième amplification est conduite en parallèle avec la première à l'aide d'un deuxième couple d'amorces : l'amorce 5' mutée est complémentaire de l'amorce 3' mutée et possède la même délétion en son centre ; l'amorce 3' flanquante s'hybride avec l'ADN cible dans sa partie 3'. L'excédent des différentes amorces est ensuite éliminé par dilution des produits d'amplification. Les deux fragments amplifiés ainsi dilués sont mélangés en quantité équimolaire. Ce mélange servira alors de matrice pour une troisième amplification en présence uniquement du couple d'amorces 5' flanquante et 3' flanquante. Le standard ainsi obtenu à la même taille et la même séquence à la délétion près (4 paires de base) que la séquence cible génomique.

Les standards internes peuvent également être synthétisés de toute pièce sans passer par la modification d'une séquence d'ADN connue. Ce type de standard décrit initialement par Wang (Wang *et al.*, 1989) est obtenu après avoir associé en contiguë toutes les amorces 5' et toutes les amorces 3' de divers gènes à étudier. Cette molécule synthétique est réalisée par une amplification génique particulière appelée "overlap extension" ou extension par homologie de séquence (Ho *et al.*, 1989).

- Les différents modèles de quantification

Au cours de chaque cycle PCR, le rendement ou taux d'amplification correspondant à la proportion moyenne de molécules se dupliquant est expérimentalement estimé à 80-90%. En réalité, ce taux d'amplification n'est observé que pendant les premiers cycles. Ensuite, le rendement diminue et la quantité de produits amplifiés tend vers une limite appelée "plateau de l'amplification". C'est pourquoi, en règle générale, la quantification n'est possible que pendant la phase exponentielle.

Dans une méthode de quantification, il ne suffit pas de mesurer la quantité d'ADN totale synthétisée dans la mesure où chaque réaction d'amplification peut générer des produits non spécifiques et des dimères d'amorces. Il convient donc d'inclure à l'analyse une méthode de détection spécifique des produits d'intérêt. De même, quelque soit la méthode de quantification utilisée, il est nécessaire d'effectuer un étalonnage par rapport à une référence de quantité connue.



**FIGURE 10 : Délétion d'un site spécifique par mutagénèse dirigée
(Perrin et Gilliland, 1990)**

Emploi de deux amorces mutées et de deux amorces flanquantes dans un modèle d'amplification génique

Les protocoles impliquant la PCR quantitative comportent fréquemment une phase de séparation qui permet de vérifier la spécificité des différentes cibles amplifiées.

Les méthodes de séparation sont très variables et influent sur le choix du système de révélation. La méthode de séparation la plus classique pour les fragments d'ADN est l'électrophorèse sur gel (acrylamide ou agarose). L'ADN peut être alors coloré par le bromure d'éthidium puis analysé par des techniques de spectroscopie performantes (Nakayama *et al.*, 1992). La limite de détection est alors de l'ordre du nanogramme.

Grâce aux radio-isotopes, on peut marquer les amorces oligonucléotidiques. Le gel est, après migration, exposé contre un film radiographique et l'intensité du signal mesurée par densitométrie (Peccoud, 1993). La radioactivité peut également être mesurée par scintillation après excision du gel des fragments d'ADN.

La tendance actuelle est plutôt l'utilisation d'amorces non radioactives. Ainsi, une amorce marquée à la fluorescéine permet la détection des produits PCR séparés sur un séquenceur automatique (Porcher *et al.*, 1992). En exploitant la grande spécificité des interactions biotine-streptavidine, il est possible d'utiliser deux amorces dont l'une est marquée à la biotine (Misiura *et al.*, 1990) et l'autre à la fluorescéine. Les produits d'amplification sont alors séparés au moyen de billes magnétiques recouvertes de streptavidine et après dénaturation en milieu alcalin, le brin marqué à la fluorescéine est libéré. La fluorescence émise permet de quantifier les produits fixés sur les billes (Landgraf *et al.*, 1991).

Les protocoles qui reposent sur une étape d'hybridation apportent une plus grande sensibilité avec des seuils de détection de l'ordre du picogramme (Chelly *et al.*, 1990).

La séparation des produits PCR par chromatographie liquide haute performance (HPLC) permet de mesurer directement des quantités d'ADN dont l'ordre de grandeur est inférieur au nanogramme (Warren *et al.*, 1991). Cette technique très prometteuse et facilement automatisable permet de mesurer des quantités d'ADN sans coloration préalable.

Il existe une très grande diversité des méthodes d'estimation de la quantité initiale. La mesure peut être faite sur des aliquots prélevés en cours d'amplification, le dosage est alors déterminé par la cinétique de l'amplification. La mesure peut également reposer sur un prélèvement unique situé dans la phase exponentielle. Cependant, la grande sensibilité de l'amplification à de petites variations du rendement nécessite d'amplifier plusieurs quantités connues de la référence (gamme) en même temps que l'échantillon à doser.

La PCR quantitative par compétition ou PCR compétitive (Gilliland *et al.*, 1990), caractérisée par l'addition d'un standard interne, est actuellement l'une des plus utilisées. Cette méthode consiste à amplifier la molécule inconnue à concentration fixe, en présence du standard en concentration connue et variable, afin de constituer une gamme. Après détermination des signaux correspondant aux produits d'amplification de la molécule à doser et du standard, la courbe "Logarithme du rapport de ces deux concentrations en fonction du Logarithme de la concentration du standard" est tracée. La quantité initiale avant amplification de la molécule inconnue peut alors être déterminée pour la valeur où le rapport est égale à 1 ($\text{Log } 1 = 0$).

La PCR quantitative dite "en temps réel" (DNA real-time quantitative PCR) semble être une autre alternative de quantification. Son principe est le suivant : le système "real-time" introduit dans chaque mélange réactionnel, un oligonucléotide spécifique de la cible à amplifier. Cette sonde possède au niveau de son extrémité 5' une structure moléculaire fluorescente associant le BET appelée "Reporter" et au niveau de son extrémité 3' une structure moléculaire "Quencher" qui de par sa proximité réduit fortement la fluorescence émise par le "Reporter". Bien que le mélange réactionnel soit soumis à une irradiation en UV, la fluorescence du "Reporter" est inhibée par un phénomène de transfert de résonance sur le "Quencher". A chaque cycle, et après appariement spécifique de la sonde sur la matrice, la Taq polymérase, au cours de l'étape d'extension d'amorce, dégrade grâce à son activité nucléasique 5'→3' la sonde fixée sur le brin en cours de "réplication". A ce stade, le "Reporter" n'est plus sous l'emprise du "Quencher" et fluoresce. La fluorescence émise est détectée puis directement traitée informatiquement. La fluorescence émise est donc proportionnelle à la quantité de produit PCR néosynthétisé. En se reportant à une gamme étalon, il est alors possible de déterminer la quantité de matrice initiale dans le mélange réactionnel. Cette détermination s'effectue à partir d'une fonction linéaire qui reporte le $\text{Log } C_t$ en fonction du nombre de cycle. C_t (threshold cycle) est défini comme la fraction du nombre de cycle nécessaire pour détecter un signal fluorescent situé à la limite du seuil de détection et émis par le mélange réactionnel. Dans le cas de la PCR quantitative en temps réel, la molécule étalon ne rentre pas en compétition avec la cible génomique d'intérêt dans la mesure où ces deux molécules sont amplifiées dans des tubes séparés.

b) Les applications médicales de la quantification par PCR

Les applications médicales de la PCR quantitative sur ADN sont beaucoup moins nombreuses que celles de la PCR quantitative sur ARN usuellement appelée RT-PCR quantitative (Reverse Transcription PCR). Cette dernière a été utilisée entre

autre comme moyen de dosage du nombre de virions HIV-1 contenus dans le plasma de patients selon le stade de l'infection (Piatak *et al.*, 1993). De même, le dosage de séquences HIV-1 dans les mononucléaires périphériques a été réalisé (Peccoud, 1993).

Un modèle de PCR semi-quantitative a permis de montrer la décroissance de la quantité de particules virales de l'hépatite B sous traitement et la réapparition de ces particules en cas d'échec thérapeutique (Bréchet, 1993).

Le champs d'action de la PCR quantitative sur ADN ne se limite pas à l'étude du virus HIV. Il a été possible de titrer des bactéries *Pneumocystis* et d'évaluer les colonisations subcliniques de cet agent (Peters *et al.*, 1992). A partir de prélèvements génitaux humains, une bactérie pathogène *Clamidia trachomatis* a également été quantifiée (De Lamballerie *et al.*, 1993).

En cancérologie, la PCR quantitative permet d'évaluer les risques de rechute de certaines leucémies après chimiothérapie (Peccoud, 1993)

La quantification des gènes impliqués dans certaines maladies génétiques permet une distinction déterminante entre porteurs homozygotes et porteurs hétérozygotes (Eron *et al.*, 1992).

3) Signes radiologiques

Le diagnostic de la toxoplasmose cérébrale est réalisé par un examen tomodynamométrique (TDM) avant et après injection de produit de contraste. Il permet de visualiser des lésions touchant les hémisphères cérébraux (jonction cortico-sous-corticale) et les noyaux gris centraux. Dans les formes encéphaliques diffuses, on peut observer une hypodensité de la substance blanche périventriculaire, une atrophie cortico-sous-corticale mais parfois des images scannographiques normales (Khong *et al.*, 1990)

L'imagerie par résonance magnétique (IRM) dont la sensibilité est supérieure à celle du TDM permet de détecter des lésions de diamètre inférieur au centimètre et d'identifier plus facilement les formes encéphaliques diffuses.

Dans le cas de la toxoplasmose congénitale, l'échographie permet d'assurer la surveillance du fœtus pendant la grossesse puis celle du nouveau-né après la naissance. Dans une série de 89 fœtus infectés, 36% d'entre eux présentaient des anomalies dont

majoritairement des dilatations ventriculaires cérébrales (Hohlfeld *et al.*, 1991). La radiologie conventionnelle (TDM et IRM) est utilisée en complément après la naissance.

4) Les signes biologiques non spécifiques

Essentiellement utilisés dans le diagnostic de la toxoplasmose congénitale, ils correspondent aux signes d'infection foetale non spécifiques de toxoplasmose mais ont le grand avantage d'orienter le diagnostic lors d'une toxoplasmose prénatale. Ces signes se traduisent par des modifications biologiques foetales au niveau sanguin : hyperéosinophilie, thrombopénie, élévation des IgM totales et signes caractéristiques de souffrances hépatiques (élévation des gamma GT et LDH) (Desmonts *et al.*, 1985 ; Daffos *et al.*, 1988a). Une élévation significative des IgA totales a également été observée (Bessières *et al.*, 1988) mais uniquement pour 5 des 10 foetus infectés.

Ainsi, bien qu'ayant une valeur prédictive modeste (environ 50% pour les Gamma GT et les IgM totales) (Berrebi *et al.*, 1992), les signes biologiques non spécifiques permettent, en l'absence de signes spécifiques d'infection, de définir une population à haut risque de toxoplasmose congénitale justifiant l'instauration sans délai d'un traitement.

B) Traitement de la toxoplasmose

La description des modes de contamination de la toxoplasmose a permis de mettre en place des méthodes de prévention afin de supprimer la propagation de la maladie au sein des groupes dits à risque. Pourtant, et notamment dans le cas de la toxoplasmose congénitale, la surveillance sérologique durant la grossesse de même que la délivrance de conseils d'hygiène (élimination de viande crue dans l'alimentation, lavage des fruits et légumes, absence de contact avec les chats domestiques, ...) n'ont pas enrayeré significativement l'incidence des séroconversions chez les femmes enceintes non prémunies. Par contre, la chimiothérapie semble avoir réduit les cas d'infection transplacentaire (Dupouy-Camet *et al.*, 1993a).

1) Traitement de la toxoplasmose congénitale

Le traitement est généralement constitué d'antibiotiques tels que la spiramycine ou l'association de pyriméthamine-sulfadiazine, triméthoprime-sulfaméthoxazole, pyriméthamine-sulfadoxine mais également par l'acide folinique.

L'emimycine, autre antibiotique, est capable d'inhiber la multiplication des parasites en s'intercalant dans leurs acides nucléiques. Cependant, l'isolement d'un mutant mille fois plus résistant à cette drogue (Pfefferkorn *et al.*, 1989) empêche son utilisation en médecine humaine. Cette mutation affecte l'enzyme responsable de son incorporation au niveau des acides nucléiques.

L'association pyriméthamine-sulfadiazine provoque un blocage séquentiel du métabolisme de l'acide folique intracellulaire. Pour cela, la sulfadiazine inhibe l'activité enzymatique de la dihydrofolate synthétase et la pyriméthamine, quant à elle, inhibe celle de la dihydrofolate réductase (Derouin *et al.*, 1993). Cette action réduit la production des acides nucléiques au sein du parasite et, par conséquence, n'affecte que les formes répliquatives (tachyzoïtes).

L'apport supplémentaire d'acide folinique évite les effets hématologiques liés à la carence en folate induite par la pyriméthamine.

Les mutants résistants aux sulfonamides (Pfefferkorn *et al.*, 1992), correspondent à des mutations affectant la dihydroptérorate synthétase, enzyme participant au métabolisme de l'acide folique (Allegra *et al.*, 1990).

La spiramycine diminue les risques de transmission materno-foetale au niveau du placenta et son utilisation, lorsque la séroconversion a eu lieu ou a de fortes chances d'avoir eu lieu en cours de grossesse, est d'autant plus recommandée qu'elle n'induit pas d'effets secondaires indésirables (Couvreur *et al.*, 1988b).

Les associations pyriméthamine-sulfadiazine et pyriméthamine-sulfadoxine sont autorisées en complément à la spiramycine lorsque l'atteinte foetale est certaine. Elles peuvent être administrées en cure de 4 à 5 semaines ou en continue jusqu'à la fin de la grossesse.

Après la naissance, il est préférable de poursuivre durant les premières années de l'enfant un traitement de plusieurs cures de "pyriméthamine-sulfamides-acide-folique" et de spiramycine durant les périodes intercalaires (Couvreur, 1993). De même, dans le cas

de l'apparition tardive d'une chorioretinite évolutive, il est primordial de reprendre un traitement antiparasitaire et anti-inflammatoire (Couvreur *et al.*, 1984).

2) Traitement de la toxoplasmose cérébrale

L'association pyriméthamine et sulfadiazine, qui semble la plus efficace (Derouin et Chastang, 1989), reste le traitement de référence de la toxoplasmose cérébrale (Leport *et al.*, 1988). Par ce traitement, les formes prolifératives (tachyzoïtes) sont tuées mais pas les formes enkystées, ce qui justifie de ne pas interrompre le traitement par crainte d'une reprise évolutive.

Bien que couramment employée pour le traitement de patients immunodéprimés (Derouin *et al.*, 1993), cette association provoque chez certains malades des effets secondaires conduisant à l'arrêt de l'un ou des deux médicaments. La sulfadiazine peut alors être remplacée par la clindamycine. L'azithromycine ou la clarithromycine associée à la pyriméthamine pourrait constituer un recours pour les patients intolérants à la sulfadiazine et à la clindamycine (Fernandez-Martin *et al.*, 1991 et Westblom et Belshe, 1988). Cependant cette thérapeutique n'élimine pas les kystes et les risques de réactivation toxoplasmique (Katlama *et al.*, 1996a).

L'association triméthoprime-sulfaméthoxazole a également été utilisée comme traitement de la toxoplasmose cérébrale (Canesa *et al.*, 1992).

Parmi les nouvelles cyclines, la minocycline est la plus active (efficacité très supérieure à la tétracycline). Son efficacité est probablement liée à sa liposolubilité. Un effet synergique est observé lorsque la minocycline est associée à la clarithromycine.

Des expériences *in vitro* à partir de kystes en culture ont montré qu'un traitement à l'atovaquone (hydroxynaphthoquinone) ou à l'azithromycine permet de réduire la viabilité des parasites intrakystiques (Derouin *et al.*, 1993 et Katlama *et al.*, 1996b). Ces médicaments pourraient réduire la charge parasitaire kystique et limiter ainsi le risque de réactivation secondaire chez les sujets immunodéprimés.

In vitro, des dérivés de la Phénylalamine entraînent une baisse importante du développement du parasite en culture (souche kystogène DUR sur des myélomonocytes humains THP-1) comparés à la pyriméthamine. Chez la souris, le dérivé "Boc-L-Phe" provoque une baisse du nombre de kystes cérébraux de 77%. On note également une

réduction de taille et une altération des membranes externes des kystes traités (Sarciron *et al.*, 1998).

Dans des modèles murins, l'IFN- γ , principale cytokine produite au cours de la toxoplasmose, présente un effet synergique avec la pyriméthamine et la clindamycine (Israelski et Remington, 1990). Elle représente, dans ces conditions, une nouvelle voie thérapeutique de la toxoplasmose cérébrale (Suzuki et Remington, 1993). Le modèle des souris SCID (Johnson, 1992) de même que le modèle murin "MAIDS" (Mouse AIDS), souris rendues immunodéficientes par infection rétrovirale (rétrovirus de la leucémie LP-BM5) (Gazzinelli *et al.*, 1992), devraient également permettre l'apparition de nouvelles stratégies propres à l'immunodéficienc.

D'autres médicaments comme la cyclosporine A, la 5 fluoro-uracile, la synéfungine, des dérivés du qinghaosu et des inhibiteurs de la synthèse des polyamines ou des quinolones ont également une activité anti-toxoplasmique (Derouin *et al.*, 1993).

Il est illusoire de supposer qu'un médicament puisse être actif sur les différents stades parasitaires et traiter la toxoplasmose sous toutes ses formes.

Il est, cependant, possible d'optimiser l'utilisation des médicaments en jouant de leur complémentarité d'action dans différentes associations. Ainsi, en agissant simultanément sur la pénétration intracellulaire, l'activité anti-parasitaire, la distribution cellulaire et tissulaire, leurs insuffisances individuelles peuvent être compensées.

L'évolution actuelle de la recherche se fait donc vers l'étude d'associations de médicaments ayant une activité synergique sur les voies métaboliques du parasite mais qui soient également complémentaires au niveau de leur distribution tissulaire et de leur mode d'action sur les sites d'infection.

Cette stratégie thérapeutique doit aussi intégrer le fait que, dans de nombreux cas, la toxoplasmose est associée à d'autres infections opportunistes chez les patients immunodéprimés. Ceci justifie la mise en place de modèles plus complexes associant plusieurs pathogènes et permettant l'évaluation de schémas thérapeutiques curatifs et prophylactiques multiples.

OBJECTIFS

La toxoplasmose causée par le protozoaire intracellulaire *Toxoplasma gondii*, suscite un intérêt tout particulier depuis l'émergence de l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine (principale infection opportuniste chez ces patients).

L'existence de cas graves de toxoplasmose congénitale humaine justifie également l'intensification des voies de recherche à visée diagnostique et immunoprophylactique.

Dans le domaine vétérinaire, la toxoplasmose congénitale est responsable de pertes importantes dans les élevages. Ce problème justifie le développement des recherches sur les volets physiopathologiques, dépistages et préventions.

Nous avons choisi de développer un test diagnostique de toxoplasmose par amplification génique destiné à dépister le plus précocément possible la maladie et à mettre rapidement en place un traitement. Après vérification de la spécificité et de la sensibilité de ce test, nous l'appliquerons d'abord à la détection de toxoplasmose congénitale au cours de la grossesse puis, à celle de toxoplasmose pulmonaire et cérébrale chez les sujets immunodéprimés.

Pour quantifier avec précision et fiabilité une charge parasitaire cérébrale et nous permettre une étude fondamentale de modèles expérimentaux murins de toxoplasmose cérébrale, nous avons entrepris d'élaborer un modèle de PCR quantitative sur ADN. Nous envisageons par la suite de l'utiliser dans l'étude de tous modèles expérimentaux nécessitant une quantification exacte d'une charge parasitaire.

Nous nous proposons d'élaborer un modèle de RT-PCR quantitative afin de mieux comprendre et d'élucider les mécanismes moléculaires qui régissent la virulence des souches du toxoplasme. Pour cela, nous chercherons à démontrer une éventuelle corrélation entre le taux d'expression d'un gène et la virulence du parasite. En terme de gène candidat, notre choix s'est orienté sur un gène de granules denses, *GRA2*. Parce que la protéine *GRA2* est sécrétée dans la vacuole parasitophore lors de l'invasion de la cellule-hôte et parcequ'elle semble jouer un rôle important dans les mécanismes de survie intracellulaire des toxoplasmes, nous supposons que ce gène pourrait être directement ou indirectement impliqué dans la virulence parasitaire.

MATERIEL
ET
METHODES

I) ABREVIATIONS ET COMPOSITION DES TAMPONS ET MILIEUX DE CULTURE

A) Solutions et tampons

| | |
|----------------|--|
| BET : | Bromure d'éthidium |
| BSA : | Sérum albumine bovine, pasteurisé (Sigma) |
| DMSO : | Diméthylsulfoxyde |
| DTT: | Dithiotréitol |
| EDTA : | Acide éthylène diamine tetraacétique |
| HEPES : | Acide N-2-hydroxyéthyl pipérazine N'-2 éthane sulfonique |
| IPTG : | Isopropyl- β -D-thio-galactopyranose |
| PBS : | Tampon phosphate (Phosphate buffered saline) : $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{H}_2\text{O}$ 0,1 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{H}_2\text{O}$ 0,1 M et NaCl 0,15 M |
| PEG : | Polyéthylène glycol |
| PPI : | Eau Pour Préparations Injectables, Laboratoire Biosedra |
| SDS : | Sodium dodécyl sulfate |

Solution de resuspension :

NaCl 0,1 M, EDTA 0,1 M et Tris-HCl 10 mM pH 7,5

Solution Denhardt 50x :

BSA 1%, ficoll 1% et polyvinylpyrrolidone 1%

Solution d'hybridation :

Dextran sulfate 0,1 g/mL, formamide désionisée 40%, SSC 4%,
Tris-HCl 20 mM pH 7,4, solution Denhardt 1x et ADN de sperme
de saumon 0,02 mg/mL

Solution Xgal 2%:

2 g de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside pour 100 μ L de
diméthylformamide

SSC 20x : NaCl 3 M, $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7/2\text{H}_2\text{O}$ 0,3 M; pH 7,2

TAE 1x : Tris-HCl 40 mM, acétate de sodium 20 mM et EDTA 1 mM pH 8,0 ;
pH 7,9

Tampon 1x (Klenow, Boehringer Mannheim) :

KPO_4 40 mM pH 7,5, MgCl_2 6,6 mM et 2 β mercaptoéthanol 1mM

Tampon de dialyse :

Tris-HCl 50 mM pH8, EDTA et NaCl 10 mM

Tampon de digestion (DNase I, Boehringer Mannheim) 1x :

Tris-HCl 50 mM pH 7,5, MgCl_2 1 mM et BSA à 0,1 mg/mL

Tampon de kination 4x (T4 polynucléotide kinase, Boehringer Mannheim) :

Tris-HCl 250 mM pH 7,5, MgCl_2 40 mM et DTT 20 mM

Tampon d'élution (purification d'oligonucléotides) :

Acétate d'ammonium 0,5 M et acétate de magnésium 10 mM

Tampon de ligation x1 :

Tris-HCl 30mM pH 7,4, DTT 10 mM, MgCl₂ 10 mM et ATP 1mM

Tampon de lyse (n°1) :

Tris-HCL 10 mM pH 8, NaCl 0,4 M et EDTA 2 mM

Tampon de lyse (n°2) :

EDTA 0,5 M pH 8, Protéinase K 100 µg/mL et N-lauryl sarcosine 0,5%

Tampon PCR 10x :

Tris-HCl 0,1 M pH 8,3, KCl 0,5 M et MgCl₂ 15 mM

TBE 10x : Tris 1 M, acide borique 0,9 M et EDTA 10 mM ; pH 8,33

TBE séquence 1x :

Tris-HCl 89 mM, acide borique 88 mM, EDTA 2 mM ; pH 7,9

TBE 10x (séquençage automatique) :

Tris Base 121,14 g/L ; acide borique 51,32 g/L et EDTA 3,72 g/L.

TBE 0,6 M : 120 mL de TBE 10x (séquençage automatique) pour 2 L d'eau ultra pure (eau Milipore mili Q)

TBS-TWEEN 20 :

Tris base 100 mM, NaCl 150mM, Tween 20 : 0,05% ; pH 7,5.

La Solution est filtrée sur filtre Millex-GS, 0,22 µm de porosité, Millipore

TE : Tris-HCl x mM et EDTA y mM ; pH 8 (x = 10,20 ou 50 et y = 5, 1 ou 0,1)

B) Milieux de culture

LB : Bactotryptone 10 g/L, extrait de levure 5 g/L et NaCl 10 g/L ; pH 7,3

M9 : Na₂HPO₄/7H₂O 6 g/L KH₂PO₄ 3 g/L, NH₄Cl 1 g/mL et NaCl 0,5 g/L ; pH 7,4

Milieu gélosé LB (ou 2TY) :

Agar 1,5%, LB 1x, 15 µL d'IPTG à 0,5M et 50 µL d'X-gal à 250 mM étalés une heure avant utilisation

Milieu minimum gélosé :

Agar 1,5%, M9 1x, MgSO₄ 1mM, Thiamine 0,5 µg/mL, Biotine 0,125 µg/mL, CaCl₂ 0,1 mM et glucose 0,2%

R10 : RPMI 1640 (Gibco), L-glutamine 2 mM (Sigma), pyruvate de sodium 1 mM (Sigma), Hépes 20 mM, sérum de veau foetal 10%, pénicilline 100 UI/mL et streptomycine 100 µg/mL

SM : Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 100 mM, MgSO₄ 10 mM et gélatine 0,1 %

Superbroth : Bactotryptone 35 g/L, extrait de levure 20 g/L et NaCl 5 g/L ; pH 7,5

2TY : Bactotryptone 16 g/L, extrait de levure 5 g/L et NaCl 5 g/L ; pH 7,4

II) PREPARATION DES OLIGONUCLEOTIDES

A) Séquences et nomenclature des oligonucléotides

1) Pour la construction d'une molécule étalon polyspécifique

5' A : TTATAACCTTGGCCGATAGGTCTAGGGATGTGCTGCAAGGCGATTA
3' A : CCTACTAGGCATTTCGGGTAAAGATTCAAGCTTATCGATACCGTCG
5' B : CCTTCTCGATCCGTTTCATGACGCGAGTTTATAACCTTGGCCGATAGG
3' B : CCCCTTAGCATTCCGCATTGTTTGCGCCTACTAGGCATTTCGGGTTA
5' C : GGTCGAGAGGCTAAATAGATCAGAAAGGAACTGCATCCGTTTCATGA
3' C : TAAAGCGTTCGTGGTCCGTAGGCGATCCCCTTAGCATTCCGCATAG
5' D : CGATGTGGCAGCATTCAAAAAGTTCCGGTTCGAGAGGCTAAATAGAT
3' D : CTTCTGCTTCATCTTCTCCTGTTCTTTAAAGCGTTCGTGCTCCGTA
5' E : GCCGCGCGCACACTGATGTCGTTCTTTCGATGTCCGAGCATTCAAAA
3' E : GCAGAATTCCCCGTCCACCAGCTATCTTCTGCTTCATCTTCTCCT

2) Gène B1 (Burg *et al.*, 1989)

B1-1 : GGAAGTGCATCCGTTTCATGAG (694-714)
B1-3 : GGCGACCAATCTGCGAATACACC (853-831)
B1-4 : TCTTTAAAGCGTTCGTGGTC (887-868)
B1-5 : AGTTCCGGTTCGAGAGGCTAAA (1951-1971)
B1-6 : GCAGTTGGTGATGGTTGCCTCGA (2014-2036)
B1-7 : CCCTTAGCATTCCGCATTGT (2144-2124)
B1-5, 4b : bbCbAbAAGTTCCGGTTCGAGAGGCTAAA (b: site biotinylé)
B1-7, 4b : bbCbAbCCCCTTAGCATTCCGCATTGT
B1-5, 1b : bAAGTTCCGGTTCGAGAGGCTAAA
B1-7, 1b : bCCCCTTAGCATTCCGCATTGT

3) Gène ARNr 18S (Johnson *et al.*, 1987 et Cazenave *et al.*, 1990)

A III : CCTTGGCCGATAGGTCTAGG (1278-1296)
A IIc : AGGCATTTCGGGTAAAGATT (1359-1340)

4) Gène *SAG1 (P30)* (Burg *et al.*, 1988 et Dupouy-Camet *et al.*, 1992)

5' P30 : ACTGATGTCGTTCTTGCGATGTGGC (418-442)

3' P30 : CGTCCACCAGCTATCTTCTGCTTCA (700-676)

5) Gène *GRA2* (Prince *et al.*, 1989; Parmley *et al.* et Mercier *et al.*, 1993)

5' GRA2 : CTTGATGAGAGAGCAGTTGG (501-520)

3' GRA2 : GTAGTGCTTCTGTCACTCTC (823-804)

S GRA2 : CGTGCATCCAGAGTGGCAGAACAACACTG (591-617)

f GRA2 : fACATTCGCGAGTTTCTTGCC (802-783) (f: site avec une fluoresceine)

6) Gène β tubuline (Nagel *et al.*, 1988)

5' β tub : GAGAAATCGTCCACGTTTCAG (206-226)

3' β tub : CCTCATTGTAGAACACATTG (826-807)

S β tub : CTGTGGAGACAGTGACTTGCAGCTGG (774-799)

f β tub : fAGGTCATCTCGGACGAACAC (266-286)

7) Oligonucléotides consensus / gène ARNr 5S

5S G : CCGGTGAATTCGCCTTAGTATGGCCG

5S D : GGCCTGGTTAGTACTCAGCTGGGGGA

5S S : GACCACTTGGGAAGTCCCGGTG

8) Oligonucléotides consensus / gène Histone H4

5' H4 : TGGGAGAATTCGGAGCCAAGAGACAC

3' H4 : AGTAGGAATTCATCCACCGAAACCGTA

S H4 : GTCACCTTACACTGAACACGCCAGGAGAAAGACCGTCAC

B) Synthèse d'oligonucléotides

Les oligonucléotides ont été synthétisés sur l'appareil "Cyclone Plus DNA Synthesizer" (Miligen/Division of Milipore) selon la méthode chimique des phosphoramidites (Bride *et al.*, 1983) par Kusnierz J.P. (Institut Pasteur de Lille).

L'incorporation d'une ou de plusieurs biotines au niveau de l'extrémité 5' terminal des oligonucléotides s'effectue selon la même méthode et nécessite l'emploi de biotinyl-phosphoramidite (Amersham).

Les oligonucléotides marqués à la fluorescéine au niveau de leur extrémité 5' et purifiés par HPLC ont été commandés chez GENSET.

C) Purification d'oligonucléotides

Les oligonucléotides, repris en fin de synthèse dans une solution d'ammoniaque à 33 %, sont lyophilisés. Le culot obtenu est solubilisé dans 100 µL d'eau. La purification consiste à déposer une fraction aliquote sur gel et à séparer, après migration, l'oligonucléotide de ses intermédiaires de synthèse. Pour cela, à un volume de solution sont ajoutés deux volumes de formamide désionisée (Bio-rad). Après 3 min de dénaturation à 90°C, le mélange refroidi dans la glace est déposé sur un gel d'acrylamide à 20 % , bis-acrylamide 0,53 % et urée 7 M. La migration effectuée sous un voltage constant de 350 V dans le tampon TBE 1x est arrêtée lorsque le bleu de bromophénol déposé dans un puit parallèle a migré d'une distance d'environ 10 cm. Après avoir déposé le gel sur une plaque de chromatographie couche mince de silice contenant un marqueur fluorescent (Merck), l'oligonucléotide est visualisé par son absorbance à une longueur d'onde de 260 nm. La bande de forte intensité est alors découpée puis incubée dans un tampon d'élution pendant 12 h à 37°C sous agitation. Les oligonucléotides sont séparés de l'éluat par chromatographie en phase inverse sur gel de silicate (C18 SEP-PAK, Milipore). La colonne est activée par 10 mL de méthanol puis lavée par 10 mL d' eau. Après fixation des oligonucléotides, la colonne est rincée à l'aide de 5 mL d' eau. L'élution s'effectue après addition de 1,5 mL d'éthanol. Les oligonucléotides sont lyophilisés et remis en suspension dans de l'eau à une concentration finale de 20 µM. La concentration de la solution d'oligonucléotides purifiés est estimée à partir de leur coefficient d'extinction molaire selon la méthode décrite par Thein et Wallace (1986).

III) CULTURES

A) Cultures cellulaires

1) Décongélation d'une lignée lymphocytaire humaine (Jurkat)

L'ampoule est sortie de l'azote liquide puis placée rapidement à 37°C. Après une agitation d'une mn, les cellules sont lavées dans 50 mL de milieu RPMI. Le culot obtenu après centrifugation à 1000 rpm à 4 °C pendant 10 mn, est remis en suspension dans 2 mL de RPMI. Après dilution au 1/50 dans du milieu R10, la suspension cellulaire (Jurkat) est incubée à 37°C sous une atmosphère enrichie en CO₂ (5%).

2) Culture de cellules lymphocytaires (Jurkat)

La préculture est diluée au 1/5 dans du milieu R10 puis incubée à 37°C sous une atmosphère enrichie en CO₂ (5%).

3) Cryoconservation de cette lignée cellulaire

50 mL de culture cellulaire en suspension (Jurkat) sont centrifugés à 1000 rpm à 4°C pendant 10 mn. Le culot est remis en suspension dans 1 mL de milieu de congélation (sérum de veau foetal, DMSO 10%) puis transféré dans une ampoule (cryotube). Après un refroidissement de 15 mn sur glace, la solution est congelée pendant 3 h dans les vapeurs d'azote puis plongée dans l'azote liquide.

B) Cultures bactériennes

1) Conservation des souches en glycérol

500 µL d'une culture en fin de phase exponentielle sont additionnés dans un cryotube de 1,5 mL (Nunc) à 500 µL d'une solution stérile de glycérol (Merck) puis stockés à -20°C.

2) Ensemencement

Les colonies bactériennes d'*E. Coli* (JM109, TG1, XL1 Blue et XL2 Blue) transformées par les plasmides d'intérêt sont individualisées sur milieu solide (LB, 2TY ou M9) à partir d'une culture glycérolée puis ensemencées dans 100 mL de milieu (LB ou 2TY) en présence de ou des antibiotiques appropriés (tétracycline à 12,5 µg/mL et/ou ampicilline à 100 µg/mL). Elles sont ensuite mises sous agitation à 37°C pendant 12 h.

IV) PREPARATIONS D'ADN GENOMIQUE

A) Préparation d'ADN génomique de *Toxoplasma gondii*

1) Préparation d'ADN de tachyzoïtes sur double gradient de Chlorure de Césium (Johnson, Dubey *et al.*, 1986)

10¹⁰ tachyzoïtes de la souche RH sont rincés deux fois en PBS. Le culot est repris dans 10 volumes de solution de resuspension. Après addition de 1/10 de volume de SDS 10%, les parasites sont incubés 30 mn à 37°C en présence de RNase A à 100 µg/mL, puis 3 h à 50°C avec 100 µg/mL de protéinase K. Au cours des deux extractions phénol/chloroforme, la phase organique de même que l'anneau protéique sont séparés physiquement de la phase aqueuse après centrifugation de 15 mn à 3000 rpm par une barrière de gélatine qui était contenue au fond des tubes de verre (DNA Single Tube, Medicobio-Biotecx). L'ADN est ensuite dialysé une nuit à 4°C contre du TE 10.1. La séparation de l'ADN de tachyzoïtes et de l'ADN de souris contaminant, basée sur une différence dans le % de GC entrant dans la composition des ADN des deux espèces, est effectuée sur gradient de CsCl. 200 µg d'ADN sont mélangés à 7,6 mL de Tris-HCl 50 mM pH 8 et EDTA 25 mM saturés en CsCl puis 200 mg de colorant Hoescht 33258 (Sigma) sont ajoutés. Un volume final de 10,57 mL obtenu par addition d'eau est déposé dans un tube à ultracentrifugation "Quick Seal" (Beckman). Le volume est complété par de la parafine et la centrifugation est effectuée 48 h à 45000 rpm (rotor Ti 90). Trois bandes d'ADN sont alors repérées sous UV, l'ADN de tachyzoïtes correspondant à la plus basse. Cette bande est prélevée à la seringue puis le colorant est extrait au N-Butanol saturé en TE 10.1. Un second gradient est effectué dans les mêmes conditions, afin d'éliminer l'ADN de souris résiduel. L'ADN est ensuite dialysé une nuit à 4°C contre du TE 10.1 puis la concentration est estimée à 260 nm.

2) Préparation d'ADN génomique à partir de tachyzoïtes isolés un à un

Un culot équivalent à 10^6 tachyzoïtes obtenus à partir du surnageant d'une culture de cellules humaines HEp-2 infectées quatre jours auparavant est repris dans 100 μ L de solution de digestion à la DNase I (Boehringer Mannheim). La réaction de digestion s'effectue 10 mn à température ambiante par 10 μ g d'enzyme en tampon 1x dans un milieu isotonique à 90/00 NaCl. Chaque tachyzoïte de la gamme repéré sur écran audiovisuel relié à un microscope photonique, est prélevé séparément à l'aide de la seringue d'un micromanipulateur (normalement utilisé pour l'injection d'ADN dans les oeufs afin d'obtenir des souris transgéniques) puis est déposé dans un tube Eppendorf de 2 mL. Ensuite les parasites individualisés par quantité croissante de la gamme (1 à 10 tachyzoïtes) sont resuspendus dans 25 μ L contenant 10^6 cellules lymphocytaires (Jurkat) afin de se rapprocher le plus possible des conditions de prélèvements biologiques (liquide amniotique humain). Les 25 μ L sont mélangés à 500 μ L de tampon de lyse (n°1) puis à 13 μ L de SDS 20 % et à 5 μ l de protéinase K 20 mg/mL (Boehringer Mannheim). Le tout est mélangé quelques secondes puis incubé une nuit à 37°C. L'ADN est précipité une nuit à -20°C en présence de 0,2 M final de NaCl, de 1 μ L de glycogène à 35 mg/mL (Appligene) et 2 volumes d'éthanol puis centrifugé 30 mn à 12000 rpm. Le culot lavé à l'éthanol 70% est séché avant d'être repris dans 20 μ L d'eau PPI.

3) Préparation d'ADN génomique de tachyzoïtes issus de liquide amniotique de rates

On récupère dans un tube Eppendorf 2 mL à l'aide d'une seringue de 1 mL équipée d'une aiguille 26 G, 100 à 300 μ L de liquide amniotique (LA) provenant de rates Fischer gestantes infectées 12 jours après fécondation par voie orale par 12000 kystes (souches Prugnauud). Après centrifugation 15 mn à 3500 rpm, le surnageant est éliminé en partie puis le culot est repris dans 25 μ L maximum de LA résiduel. Ces 25 μ L sont ensuite traités comme décrit ci-dessus, paragraphe 2.

4) Témoin positif pour la PCR

5 à 10 parasites prélevés et traités à la DNase I comme décrit dans ce chapitre paragraphe 2, sont directement déposés dans un microtube 0,5 mL Robbins (Poly Labo) puis resuspendus dans 20 μ L d'eau PPI et immédiatement chauffés 3 mn à 95 °C. Le tout est refroidi dans la glace, centrifugé quelques secondes à 10000 rpm et maintenu de

nouveau dans la glace pour servir ensuite de matrice en tant que témoin positif d'amplification.

5) Préparation d'ADN génomique à partir des parasites (kystes)

Des souris infectées par voie intrapéritonéale depuis plus d'un mois sont sacrifiées par dislocation cérébrale. Chaque cerveau prélevé est séparé au niveau du plan de coupe longitudinal en deux parties égales dont l'une servira au comptage manuel des kystes présents (McLeod *et al*, 1989). L'autre moitié est ensuite divisée en cinq parties équivalentes et de volume inférieur à 100 μ L. Chacune de ces cinq fractions est ensuite traitée de la même façon. Chaque morceau de cerveau est repris dans 100 μ L de PBS et broyé à l'aide d'un piston (Piston pellet bleu, Poly Labo) à usage unique dans un microtube de 1,5 mL puis homogénéisé par passages répétés à travers une aiguille 21G. Le tout est ensuite transféré dans un microtube Eppendorf de 2 mL. Après centrifugation de 10 mn à 3000 rpm, le surnageant est éliminé. Le culot est repris dans 50 μ L d'une solution de Trypsine (Trypsine liquide 1x 0,25% 1:250, Gibco BRL), incubé 10 mn à 37°C puis placé sur glace. Ce volume d'environ 100 μ L est traité selon la méthode standard décrite par le fabricant (IsoQuick:Nucleic Acid Extration Kit, Microprobe corporation). Le culot est repris dans 40 μ L d'eau PPI. Les cinq fractions sont ensuite réunies soit 200 μ L final de solution d'ADN génomique total équivalent à un demi cerveau.

B) ADN génomique humain

Les cultures de cellules lymphocytaires humaines sont centrifugées à 1000 rpm pendant 10 mn à 4°C. Le culot cellulaire est lavé en milieu RPMI puis l'ADN génomique est préparé selon la méthode standard décrite par le fabricant (IsoQuick : Nucleic Acid Extration Kit, Microprobe corporation)

C) ADN génomique de souris

Un foie de souris OF1 fraîchement prélevé est lacéré dans 3 mL de tampon de lyse (n°2) et placé dans ce même tampon pendant 3 h à 50°C (10 volumes de tampon par volume de tissu initial). Une succession d'extraction (3x) au phenol et de dialyse en boudin (3x 1 h contre le tampon de dialyse) permet respectivement de supprimer les protéines et de diminuer la concentration ionique de la solution. Les ARNs sont alors

digérés sélectivement par la RNase A (100 µg/mL) pendant 3 h à 37°C. De nouvelles extractions au phénol/chloroforme (2x) et dialyses (3x 1 h contre le tampon TE 10.1) permettront d'extraire successivement l'enzyme et le phénol résiduel. La concentration en ADN de l'échantillon est déterminée par l'absorbance à 260 nm et la pureté de la solution testée par l'étude de son spectre d'absorption. On vérifie que le rapport des absorbances à 260 et 280 nm est de l'ordre de 1,8. L'état de l'ADN est vérifié après migration d'un aliquot équivalent à 1 µg sur gel d'électrophorèse à 0,3% d'agarose. Cet ADN purifié doit migrer plus lentement qu'un ADN intact de bactériophage λ.

V) PREPARATION D'ACIDE NUCLEIQUE TOTAUX (ANt)

Préparation d'ANt de tachyzoïtes

Les tachyzoïtes sont obtenus à partir du surnageant d'une culture de cellules humaines Hep-2 (infectées quatre jours auparavant) en milieu Dulbecco (Gibco BRL), 3,7% NaHCO₃, 10% serum de veau (JRH) pH 7,2. La solution de tachyzoïtes maintenue dans la glace est ensuite centrifugée à 3500 rpm pendant 15 mn à 4°C. La préparation des acides nucléiques totaux (ANt) s'effectue à partir d'un culot de 10⁹ tachyzoïtes traité selon la méthode standard décrite par le fabricant (IsoQuick : Nucleic Acid Extration Kit, Microprobe corporation). Une variante de ce protocole permet une préparation plus rapide de l'ADN génomique.

VI) PREPARATION D'ARN : RNAzol B (Bioprobe)

A) Préparation d'ARN de tachyzoïtes

10⁸ à 10⁹ tachyzoïtes obtenus à partir d'un surnageant de culture de cellules humaines Hep-2 sont maintenus dans la glace puis rapidement centrifugés à 3500 rpm pendant 10 mn à 4°C. Après élimination du surnageant, le culot est resuspendu dans un mL de RNAzol B froid puis immédiatement congelé dans l'azote. Après décongélation dans la glace, l'ARN est solubilisé par pipetages successifs du lysat puis extrait après addition de 200 µL de chloroforme. Pour cela, les 1,2 mL de solution sont mélangés vigoureusement pendant 15 s puis sont laissés reposer 5 mn dans la glace. La suspension est centrifugée 13000 rpm à 4°C pendant 15 mn puis la phase aqueuse (phase supérieure incolore) est transférée dans un tube eppendorf. L'ARN est précipité une nuit à -20°C

après addition d'un volume d'isopropanol. Le culot est lavé à l'éthanol 70% après centrifugation 13000 rpm à 4°C pendant 15 mn. Le culot est ensuite resuspendu dans 50 µL d'eau PPI. La solution d'ARN est alors conservée à -80°C.

B) Préparation d'ARN de bradyzoïtes

Une souris infectée par voie intrapéritonéale (souche 76 K) depuis plus d'un mois est sacrifiée par dislocation cérébrale. Le cerveau prélevé est séparé en deux parties égales. L'une des deux moitiés est secondairement divisée en cinq parties équivalentes. Chaque morceau déposé dans un tube eppendorf de 1,5 mL est alors immédiatement refroidi dans l'azote. Chacune de ces cinq fractions est ensuite traitée de la même façon. Chaque morceau congelé est mélangé à 150 µL de RNAzol B puis broyé et homogénéisé à l'aide d'un piston (Piston pellet bleu, Poly Labo) à usage unique (dans la glace). Le tout ajusté à 1 mL de RNAzol B, est ensuite mélangé vigoureusement puis recongelé dans l'azote liquide. Après décongélation dans la glace et addition de 200 µL de chloroforme, l'ARN est extrait (solution préalablement mélangée vigoureusement 15 s et laissée reposer 15 s dans la glace). Après centrifugation 13000 rpm à 4°C pendant 20 mn, 550 µL de surnageant sont récupérés. L'opération est recommencée après addition d'un volume de chloroforme. L'ARN est précipité sur la nuit à -20°C, après addition d'un volume d'isopropanol. Le culot lavé à l'éthanol 80%, repris dans 50 µL d'eau PPI, est resuspendu 10 mn à 65°C. La solution d'acides nucléiques totaux est refroidie dans la glace. Les 5 tubes correspondants à un demi cerveau sont réunis puis les 250 µL résultants sont alors conservés à -20°C. L'ADN sera dégradé ultérieurement par un traitement à la DNase.

VII) Préparation d'ADN plasmidique

A) Maxiproduction de plasmide recombinant

100 µL d'une culture bactérienne glycérolée sont incubés une nuit à 37°C sous agitation dans 1 L de milieu LB-Ampicilline (100 µg/mL). Le culot bactérien obtenu après centrifugation (3500 rpm, 15 mn à 4°C) est traité selon la méthode standard décrite par le fabricant (Plasmide Maxi Protocol, Qiagen). Le culot d'ADN plasmidique ainsi purifié est repris dans 500 µL d'eau PPI ou dans 4,8 mL de TE 20.1 si l'on poursuit par une purification plasmidique sur gradient de CsCl. La qualité de l'ADN est vérifiée sur gel d'agarose et la quantité dosée à partir de son absorbance à 260 nm.

B) Purification de plasmide sur gradient de Chlorure de Césium (CsCl)

Aux 4,8 mL de solution d'ADN plasmidique sont mélangés 0,4 mL d'une solution de BET (5 mg/mL) puis 8,4 g de CsCl (densité finale: 1,8). Chaque moitié de ce mélange est déposée au fond d'un tube "quick seal" à l'aide d'une pipette pasteur sous une couche de 8,5 mL d'une solution de CsCl en TE 20.1 (densité finale: 1,47) préalablement déposée. Les deux tubes sont ensuite complétés et équilibrés avec une solution à 1,47 de densité puis centrifugés 45000 rpm, 20 h à 15°C (Rotor Ti 70, ultracentrifugeuse L8-M, Beckman). La bande la plus basse est récupérée. A ce volume est additionné 2 volumes de 1-Butanol (Merck) saturé en CsCl. L'opération est répétée une à deux fois jusqu'à extraction complète du BET. Afin d'éliminer le CsCl, la phase aqueuse déposée dans un ultrafiltre tube collodion (Sartorius) est dialysée contre du TE 20.1, pendant 12 h. La concentration du plasmide est déterminée à partir de son absorbance à 260 nm de longueur d'onde.

C) Préparation d'ADN monobrin (séquençage)

1) M13mp 18

Une colonie TG1 ou JM109 isolée sur milieu M9 est resuspendue dans 5 mL de milieu 2TY puis mise sous agitation une nuit à 37°C. La culture de nuit est diluée au 1/10 dans 10 mL de milieu 2TY. Lorsque la culture bactérienne a atteint une absorbance de 0,3 pour une longueur d'onde de 600 nm, elle est alors infectée pendant 5 h en présence de 100 µL de surnageant correspondant au phage recombinant. L'ADN monobrin correspondant au phage M13 est ensuite préparé selon la méthode décrite par les auteurs (Maniatis, Fritsch *et al.*, 1990).

2) pBluescript

Les phagemides pBluescript double brin gardent la possibilité de produire un ADN monobrin. Pour cela, une culture en milieu Superbroth d'une colonie sélectionnée en phase exponentielle est diluée de façon à obtenir une $DO_{600} = 0,05$ puis remise en culture environ 45 mn afin d'obtenir une absorbance de 0,01. Le phage "helper" VCS-M13 (Stratagene) est alors inoculé dans la culture à raison de 10 phages par

bactérie. Après une nuit de co-culture, les bactéries sont éclatées par chauffage 15 mn à 65°C. Les phages libérés dans le surnageant sont précipités pendant 30 mn à température ambiante, par une solution d'Acétate de Sodium 3,5 M pH 7,5 PEG 20% diluée dans du tampon SM. Le culot de phages est ensuite repris en TE 10.1 et les ADN monobrinés qu'ils contiennent sont purifiés par extraction phénolique et précipitation à l'éthanol.

3) pBluescript et "TA cloning"

Pour obtenir des colonies "mâles" isolées XL1-Blue, XL2-Blue (Stratagene) et INV α F' (Kit TA Cloning System, Version 1.3, Invitrogen), 10 μ L d'une culture glycérolée sont étalés sur milieu solide 2TY, Tétracycline 12,5 mg/mL et Ampicilline 100 mg/mL puis incubés une nuit à 37°C. La résistance à la Tétracycline permet la sélection du facteur F'. Cet épisode intervient également dans la différenciation des pilis par l'intermédiaire desquels le bactériophage "helper" VCS-M13 infeste les bactéries *E. Coli*. La résistance à l'Ampicilline sélectionne le vecteur pBluescript ou "TA-Cloning".

Une colonie resuspendue dans 50 μ L de 2TY est infestée par addition d'un μ L de phage "helper" VCS-M13 à 10¹¹ pfu/mL (Stratagene) pendant 15 mn à température ambiante. La sélection du vecteur est maintenue en incubant ce mélange 1 h à 37°C sous agitation dans 500 μ L de 2TY, Ampicilline 100 μ g/mL. La production de phage recombinant est obtenue après incubation une nuit à 37°C de quatre fractions, chacune de 100 μ L dans 4 mL de 2TY Ampicilline 100 mg/mL.

La libération complète des phages est obtenue après la lyse des bactéries par un traitement de 20 mn à 65°C. Les débris sont éliminés par deux étapes de centrifugation 3500 rpm à 4°C pendant 20 et 10 mn. Les particules virales sont précipitées une nuit à 4°C après addition de 300 μ L d'une solution 20% PEG et 2,5 M NaCl en milieu SM à 1,2 mL de surnageant récupéré. Après deux centrifugations de 10 mn à 10000 rpm à température ambiante, le PEG est complètement éliminé de chaque culot phagique. Ces derniers sont repris chacun dans 20 μ L de TE 10.0,1 puis réunis. L'ADN est extrait des particules phagiques par trois traitements phenol/chloroforme saturé en TE 10.1. La phase organique est éliminée par trois extractions éther saturé en TE 10.1. L'ADN est précipité une nuit à -20°C par addition de 1/10 de volume d'acétate de sodium 3 M pH 5,2 et de 2 volumes d'éthanol. Après centrifugation, le culot est lavé à l'éthanol 70 %, séché puis repris dans 30 μ L d'eau PPI.

D) Production et dénaturation d'ADN plasmidique double brin (séquençage)

L'ADN plasmidique est préparé par "mini" ou "midi Quiagene" selon la méthode décrite par le fournisseur (Quiagene plasmid kit, C.O.G.E.R.). 10 µg d'ADN sont dénaturés 10 mn à température ambiante par 8 µL de NaOH 2 N dans un volume final de 40 µL. L'ADN est précipité 2 h à -80°C après addition de 7 µL d'acétate de sodium 3 M pH 4,8 ; 4 µL d'eau PPI et 120 µL d'éthanol à -20°C. Le tout s'effectue dans la glace. Après centrifugation 13000 rpm à 4°C pendant 30 mn, le culot d'ADN est lavé deux fois à l'éthanol 70% froid puis séché brièvement sous une lampe chauffante. Le culot est alors repris dans 10 µL d'eau PPI, dans la glace. La réaction de séquençage est enchaînée immédiatement.

VIII) AMPLIFICATION DE SEQUENCES NUCLEOTIDIQUES SPECIFIQUES

La technique de PCR consiste à amplifier en chaîne une séquence d'ADN spécifique, à l'aide de deux oligonucléotides synthétiques dont les séquences sont situées de part et d'autre de cet ADN. La réaction d'amplification s'effectue en tampon PCR 1x, en présence d'un mélange de désoxynucléotides (dCTP, dGTP, dATP, dTTP, 200 µM final chacun), des deux amorces (0,5 µM), d'un ng à un µg maximum d'ADN matrice par 1,25 unités de Taq polymérase (Perkin Elmer Cetus) dans un volume final de 50 ou 100 µL. La solution est recouverte par 100 µL d'huile minérale dans le but d'éviter toute évaporation. Ce mélange est alors soumis en fonction des conditions expérimentales choisies à 20-55 cycles d'amplification, chacun défini par les trois étapes suivantes :

- une dénaturation de l'ADN à 94°C pendant 45 s à 1 mn.
- une hybridation des amorces nucléotidiques à l'ADN simple brin après une incubation à 35 à 70°C pendant 30 s à 1 mn.
- une synthèse des nouveaux brins à 72°C pendant 1 à 3 mn.

Afin de diminuer la possibilité d'appariement aspécifique et de minimiser les risques de contamination par une autre matrice au moment de l'ouverture des tubes, l'enzyme est ajoutée avant la première étape de dénaturation (5 mn à 94°C) précédant celle du premier cycle. Pour permettre une complète séparation des deux brins d'ADN, la matrice est dénaturée 10 mn à 94°C puis immédiatement stockée dans la glace avant d'être incluse au mélange réactionnel. En fin de réaction, une étape de polymérisation de 7 mn à 72°C permet de s'assurer que la polymérisation des brins en cours est achevée. Cette étape est cependant supprimée dans le modèle de la PCR quantitative sur ADN, dans la mesure où elle peut favoriser l'apparition de produits PCR aspécifiques. L'automatisation de ces étapes est assurée grâce au "thermo cycler" Perkin Elmer Cetus.

La phase aqueuse est séparée de la couche d'huile minérale par une extraction chloroforme/alcool isoamylique (24/1)

IX) REVERSE TRANSCRIPTION / POLYMERASE CHAIN REACTION (RT/PCR)

2 µg d'ANt sont digérés 45 mn à 37°C par 1 unité de DNase I (Boehringer Mannheim) dépourvue de RNase A en tampon 1x (tampon 5x, kit M-MLV reverse transcriptase, Gibco BRL) dans un volume final de 10 µL. Un traitement thermique de 10 mn à 70°C dénature les structures secondaires de l'ARN et inactive l'enzyme. Le produit de digestion est refroidi rapidement dans la glace. L'étape d'appariement entre la queue polyadénylée des ARNs et l'amorce s'effectue en présence de 1 µg d'oligonucléotide polydésoxythymidine de 15 bases (Boehringer Mannheim) dans un volume final de 12,5 µL après une dénaturation initiale de 5 mn à 70°C, suivie d'un refroidissement progressif de 10 mn en maintenant le tube réactionnel à température ambiante. La réaction de synthèse du brin complémentaire s'effectue dans un volume final de 20 µL par 200 unités d'enzyme (M-MLV reverse transcriptase, Gibco BRL) en tampon 1x (Tampon 5x), en présence d'un mélange équimolaire de désoxynucléotidetriphosphates à 0,5 mM chacun (Pharmacia), de dithiothreitol (DTT) (Gibco BRL) à 0,01 M et de 20 unités de RNAsin (Promega) et cela pendant 1 h à 37 °C, puis 30 mn à 45°C. La réaction est stoppée par un traitement de 3 mn à 90°C. La réaction d'amplification s'effectue en utilisant 5 µL de produit réactionnel issu de la RT comme matrice pour un volume final de 50 µL.

X) PURIFICATION SUR GEL D'AGAROSE DE FRAMENTS D'ADN

A) Fragments inférieurs à 1500 pb

Un aliquot de solution d'ADN pour des fragments allant de 1500 à 100 paires de bases est déposé sur un gel d'agarose de 1 à 2 %. Après migration dans le tampon TAE 1x sous un voltage constant de 80 V et après coloration du gel par une solution de BET (Bromure d'Ethidium) (0,5 µg / mL), le produit d'amplification est visualisé sous ultra-violet (260 nm). Le fragment PCR de taille attendue est découpé puis déposé dans un tube de centrifugation (SPIN-X, Costar) sur une membrane d'acetate de cellulose d'une porosité de 0,22 µm . Le fragment est élué par centrifugation à 6000 rpm pendant 10 mn, puis précipité une nuit à -20°C par addition de 1/10 de volume d'acétate de

sodium 3M à pH 5,2 et de 2 volumes d'éthanol 100%. Après 30 mn de centrifugation à 13000 rpm, le culot d'ADN est lavé dans une solution d'éthanol à 70% puis repris en TE 10.1 La concentration est déterminée sur minigel d'agarose.



B) Fragments supérieurs à 1500 pb

Un aliquot d'une solution d'ADN est déposé sur un gel d'agarose LMP (Low Melting Point Agarose, BRL) de 1,2%. Après migration dans le tampon TAE 1x, sous un voltage constant de 80 V et après coloration du gel par une solution de BET (0,5 µg/mL), l'ADN est visualisé sous ultra-violet (260 nm). Le fragment de taille attendue est découpé puis déposé dans un tube de polypropylène de 14 mL (Falcon). L'agarose est fondu à 65 °C dans un bain marie et régulièrement homogénéisé au vortex. Sont ensuite ajoutés 2 volumes de TE 50.5 préalablement chauffés à 65°C. Le tout est vigoureusement mélangé puis maintenu à 37°C. Après addition d'un volume de phenol saturé en TE 10.1 et préalablement chauffé à 37°C, l'ADN est extrait de l'agarose pendant 5 mn à 37°C. Ce mélange est centrifugé à température ambiante à 7000 rpm pendant 20 mn. La phase aqueuse récupérée, est réextraite au chloroforme saturé en TE 10.1. Après centrifugation dans les mêmes conditions, 3 extractions à l'éther saturé en TE 10.1 seront effectuées. L'ADN est ensuite précipité puis repris en TE 10.1.

XI) CLONAGE DES FRAGMENTS PCR.

A) Clonage d'un fragment PCR aux extrémités bouts francs

1) Traitement à la Klenow

Dans l'hypothèse où la Taq polymérase s'interromprait avant d'atteindre l'extrémité 3' des produits d'amplification au cours de l'élongation finale, un traitement supplémentaire à la Klenow permet alors d'obtenir des fragments PCR aux extrémités bouts francs. Ainsi, l'élongation complète des brins néosynthétisés des produits PCR s'effectue par 2 unités d'enzyme de Klenow (Boehringer Mannheim) à 37°C pendant 30 mn dans un milieu réactionnel constitué d'un mélange de désoxyribonucléotides triphosphates (dATP, dCTP, dTTP, dGTP 100 µM chacun), de tampon 1x et de 100 ng de fragment PCR. Un traitement à la chaleur (10 mn à 70°C) permet d'arrêter la réaction enzymatique. Après avoir ramené le volume final à 500 µL, les protéines sont éliminées

par deux extractions phenol/chloroforme. La phase aqueuse est débarrassée du phenol résiduel par deux extractions au chloroforme. Après précipitation à l'acétate de sodium et éthanol, le culot d'ADN est repris dans 20 μ L d'eau PPI puis quantifié à partir d'un aliquot.

2) Traitement à la T4 polynucléotide kinase (Boehringer Mannheim)

Afin d'augmenter l'efficacité de ligation entre le fragment PCR et le vecteur de clonage, les extrémités 5' OH libres des fragments d'amplification générés lors de la synthèse des amorces oligonucléotidiques sont phosphorylées dans le tampon de kination. Ainsi dans un mélange réactionnel de 10 μ L final, la quantité d'insert adéquate est phosphorylée par 5 unités (T4 polynucléotidekinase, Boehringer Mannheim) pendant 30 mn à 37°C.

B) Clonage d'un fragment PCR dans le vecteur "TA Cloning"

Principe du clonage

Le système "TA Cloning" (TA Cloning System, Version 1.3, Invitrogen) exploite à son avantage une des propriétés de la Taq polymérase Perkin Elmer Cetus. Cette polymérase thermostable utilisée en PCR rajoute au niveau de l'extrémité 3' terminal d'un ADN linéaire double brin une désoxyadénosine supplémentaire. Le principe consiste alors à introduire un tel fragment PCR dans un vecteur dont les extrémités cohésives sont chacune constituées par une désoxythymidine complémentaire.

C) Ligation

1) Dans M13mp 18 coupé par Hind III

10 μ L d'insert phosphorylé (la quantité d'insert est calculée pour obtenir 5 fois plus de molécules d'insert que de vecteur) sont additionnés à 50 ng de vecteur de clonage M13mp18 linéarisé par Hind III puis ajustés dans un volume final de 20 μ L de tampon de ligation 1x. La ligation s'effectue par 5 unités de ligase (Appligene) à température ambiante pendant 15 h.

2) Dans le vecteur "TA Cloning"

1 μ L de produits PCR ou une quantité de fragments PCR purifiés, équivalente à 5 fois plus de molécules d'insert que de vecteur, est ligué en présence de 50 ng de vecteur "TA Cloning " selon la méthode décrite par le fabricant (Kit TA Cloning System, Version 1.3, Invitrogen)

D) Sous-clonage dans pUC 18

Le transfert d'insert du vecteur M13mp 18 au vecteur de sous-clonage pUC 18 (Pharmacia) permettra d'augmenter la production de la quantité de plasmides recombinants. Ainsi, 500 ng d'ADN double brin M13mp 18 recombinant sont digérés par EcoR I et Pst I (Boehringer Mannheim) en présence de RNase A (Boehringer Mannheim). Le fragment de restriction est ensuite purifié sur gel d'agarose. L'insert et le vecteur (100 ng de pUC 18 linéarisé), dans un rapport de 3 pour 1, sont mis en ligation une nuit à 16°C en présence de 5 unités de ligase (Appligene) en tampon de ligation 1x (Appligene). L'ADN plasmidique recombinant est introduit dans les bactéries (JM109) par électroporation puis l'insert est identifié.

XII) TRANSFORMATIONS BACTERIENNES

A) Transformation par électroporation

1) Préparation de bactéries compétentes

a) Bactéries compétentes fraîchement préparées

Une colonie JM109 (ou TG1) ou une colonie XL-1 Blue isolée respectivement sur milieu gélosé M9 ou sur milieu gélosé LB Tétracycline (12,5 μ g/mL) est resuspendue dans 5 mL de milieu 2TY ou LB. La culture de nuit est ensuite diluée au 1/50 en 2TY ou LB. Après 1 h à 37°C sous agitation, 3 mL de culture ($A_{600} = 0,8$ à 600 nm) sont centrifugés à 5000 rpm pendant 5 mn à 4°C. Le culot bactérien est ensuite lavé dans 2 mL d'eau PPI puis secondairement dans 1 mL. Le culot est ensuite conservé dans la glace, après avoir été resuspendu dans 50 μ L d'eau PPI.

b) Bactéries compétentes conservées à -80°C

Une culture de nuit (JM109, TGI et XL-1 blue) relancée au 1/100 dans 500 mL de milieu LB, est refroidie dans la glace lorsque la densité optique à 600 nm est de 0,7. Le culot bactérien, obtenu après une centrifugation de 5000 rpm à 4°C pendant 15 mn, est lavé deux fois dans 20 mL d'une solution stérile de glycérol froid à 10%. Le culot est ensuite repris dans 3 mL de glycérol 10%. Cette solution de bactéries compétentes est ensuite aliquotée en 50 µL dans des tubes Eppendorf froids pour être conservées à -80°C.

2) Microdialyse de l'ADN plasmidique recombinant

10 µL du mélange réactionnel de ligation, équivalent à 50 ng de vecteur, sont microdialysés 1 h à température ambiante sur un filtre de 0,025 µm de porosité (type VS, Millipore).

3) Electroporation

50 µL de bactéries compétentes, fraîches ou décongelées, sont mis au préalable en contact avec 7,5 µL de dialysat pendant 10 mn dans la glace. Ce mélange est déposé dans une cuvette d'électroporation de 2 mm de largeur (Eurogentec), puis l'ADN plasmidique recombinant est introduit dans les bactéries par électroporation (2500 V, 132 Ω, 40 µF) à l'aide d'un électroporateur (Cell ject, cell electroporation system, Eurogentec). La solution de bactéries transformées est remise en culture 30 mn à 37°C en présence de 200 µL d'une culture de bactéries en phase exponentielle ($A_{600} = 0,8$ à 600 nm).

B) Transformation en "TA Cloning"

Les plasmides recombinants sont introduits dans les bactéries compétentes selon la méthode décrite par le fabricant (Kit TA Cloning System, Version 1.3, Invitrogen). Les bactéries fournies dans le kit peuvent être substituées par des bactéries compétentes commercialisées (Epicurian Coli XL2-Blue MRF' ultracompetent cells, Stratagene).

C) Sélection et identification des transformants

1) Vecteur M13

Après électroporation, les 250 μL de co-culture sont mélangés à 3 mL de solution Top-Agar (55°C) complétés avec 40 μL d'IPTG à 100 mM et 40 μL d'une solution Xgal à 2% puis étalés sur milieu 2TY. Les boîtes de Pétri sont incubées une nuit à 37°C. Les plages de lyse bleues sont considérées négatives en terme de ligation. Chacune des plages de lyse blanche sélectionnées est récupérée dans 1,5 mL d'une préculture de bactéries mâles (JM109) en phase exponentielle ($A_b = 0,3$) puis incubée 5 h à 37°C. Ce volume est centrifugé 3 mn à 10000 rpm. Le surnageant, équivalent à une production de phages recombinants, est ensuite récupéré en présence de 20 μL de chloroforme puis conservé à 4°C.

8 μL de surnageant (phages en suspension) sont incubés en présence de 1,5 mL d'une préculture de bactéries mâles (JM109) en phase exponentielle ($A_b = 0,3$ à 600 nm) pendant 5 h à 37°C. Après centrifugation 3 mn à 13000 rpm l'ADN phagique (M13 mp18 recombinant) double brin est obtenu à partir du culot bactérien par une minipréparation de plasmide selon la technique de lyse alcaline (Maniatis, Fritsch *et al.*, 1990). L'insert est libéré du plasmide recombinant en utilisant les enzymes de restriction appropriés en présence de RNase A. L'insert de taille attendue est ensuite identifié après séparation par électrophorèse des produits de digestion sur un gel d'agarose.

2) Vecteur "TA Cloning"

Les transformants sont sélectionnés sur milieu solide LB agar contenant 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ d'ampicilline et 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ d'X-gal. Le milieu de sélection est dépourvu d'IPTG dans la mesure où le plasmide recombinant n'exprime pas le répresseur de l'opéron Lactose. Chacune des colonies blanches sélectionnées est reprise dans 3 mL de milieu LB-Ampicilline (50 mg/mL) une nuit sous agitation à 37°C. L'ADN plasmidique est préparé à partir de 1,5 mL de cette culture selon la technique de lyse alcaline (Maniatis, Fritsch et col. 1990). Le matériel est digéré par les enzymes de restriction appropriés en présence de RNase. Après séparation par électrophorèse sur gel d'agarose, le matériel coloré au BET est analysé. Les transformants positifs sont conservés sous forme glycérolée à -20°C.

3) Vecteur pUC 18.

Les 50 μL de bactéries transformées sont remis en culture 1 h à 37°C dans 1 mL de milieu LB. Différents aliquots (50, 100 et 200 μL) sont étalés sur milieu gélosé LB puis incubés une nuit à 37°C. Chacune des colonies blanches sélectionnées est reprise dans 5 mL de milieu LB-Ampicilline (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) une nuit à 37°C. L'ADN plasmidique est purifié à partir du culot bactérien issu de 1,5 mL de culture selon la technique de lyse alcaline (Maniatis, Fritsch *et al.*; 1990). Le fragment de restriction EcoR I-Pst I est ensuite identifié sur gel d'agarose. Les colonies positives sélectionnées sont conservées à -20°C en milieu LB-Ampicilline (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) sous forme glycérolée.

XIII) SEQUENÇAGE

Les réactions de séquençage sont effectuées selon le principe de la réaction de terminaison de chaîne (Sanger, Nicklen *et al.*, 1977) en présence de déaza-didéoxynucléotides.

A) Séquençage

1) Séquençage manuel

Les réactions de séquençage ont été réalisées selon les méthodes décrites par les fournisseurs:

- Multiwell Microtitre Plate DNA Sequencing System (Amersham), en présence de $\alpha^{35}\text{S}$ -dCTP (Amersham).
 - Deaza G/A ^{32}P Sequencing Mixes (Pharmacia) en présence de $\alpha^{35}\text{S}$ -dATP (Amersham)
- Les échantillons sont déposés après une dénaturation de 5 mn à 95°C sur un gel de polyacrylamide 6%, urée 8,4 M en tampon TBE séquence 1x. Après environ 3 h 30 mn de migration, le gel est fixé 15 mn dans une solution d'acide acétique 10% et de méthanol 10%, séché sous vide puis autoradiographié 12 h ou plus à température ambiante (Film β -max/ ^{35}S , Amersham).

2) Séquençage automatique

Les réactions de séquençage ont été effectuées suivant les indications du fournisseur (Autoread sequencing kit, Pharmacia). Les produit réactionnels marqués à la fluorescéine par l'intermédiaire des amorces (universelle ou reverse), préalablement dénaturés 5 mn à 95°C, sont détectés à l'aide d'un rayon laser (Pharmacia LKB A.L.F Sequencer, Pharmacia) au cours de leur séparation sur un gel polyacrylamide 6%, urée 7 M en tampon TBE 0,06 M. L'information est enregistrée puis traitée par informatique.

B) Analyse des séquences

Les séquences primaires d'ADN ont été comparées à la banque de données Genbank/EMBL (nombre d'entrées: 199813)

XIV) TRANSFERT D'ADN SUR FILTRE DE NYLON

A) Southern Blot

Les produits d'amplification de même que les fragments de restriction sont séparés sur un gel d'électrophorèse d'agarose en TBE 1x, sous un ampérage constant de 35 mA. Dans le cas du modèle de la PCR quantitative sur ADN ou celui de la détection de *Toxoplasma gondii* par PCR, les produits d'amplification sont séparés sur un gel d'agarose NuSieve 3% (3/4 NuSieve GTG agarose et 1/4 SeaKem GTG agarose, Tebu) en TBE séquence 1x puis sont révélés par chimioluminescence. La migration est arrêtée à 13 cm environ des puits de dépôts, c'est à dire lorsque le bleu de bromophénol est sur le point de sortir du gel. Ceci permet d'une part de détacher le ou les produits d'amplification de la trainée occasionnée par l'amorce biotinylée et d'autre part de séparer physiquement les signaux de révélation émanant de fragments de taille différente.

Le transfert du matériel nucléique est réalisé par capillarité selon la technique standard de Southern (Maniatis, Frisch *et al.*, 1990). La membrane de nylon (Hybond-N, Amersham) est déposée sur une solution 2x SSC quelques minutes face ADN vers le haut puis séchée 10 mn à 80°C. L'ADN est ensuite fixé covalamment sur la membrane par un traitement de 3 mn sous UV (280 nm).

B) Dot Blot

Les échantillons, dénaturés 10 mn à 95°C puis refroidis immédiatement dans la glace, sont dilués par addition d'un volume d'une solution 20x SSC froid. Ils sont ensuite déposés sous vide à l'aide d'un appareil de filtration (Hybri.Dot Manifold de filtration à 96 puits, GibcoBRL) dans des puits de 3 mm de diamètre sur une membrane de nylon N⁺ (Amersham) préalablement imbibée en 10x SSC. L'ADN est fixé 30 mn à température ambiante par une solution NaOH 0,4 M. Pour cela, la membrane de nylon est déposée face ADN vers le haut sur une feuille de Wattman (3 mm d'épaisseur) imbibée par la solution de soude. La membrane est ensuite rincée quelques minutes sous agitation dans une solution 5x SSC à température ambiante. La membrane peut être alors préhybridée ou séchée pour être stockée à 4°C.

XV) PREPARATION DES SONDAS NUCLEIQUES

A) Marquage de sondes oligonucléotides par le ³²P

20 pmol d'oligonucléotides (25 bases environ) sont marqués au niveau de leur extrémité 5' après une incubation de 30 mn à 37°C, en présence de 4 unités de T4 polynucléotide kinase (Boehringer Mannheim), dans un mélange réactionnel en tampon de kination 1x et contenant 50 µCi de $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP pour un volume final de 20 µL. La réaction est arrêtée par addition de 0,5 nmol d'EDTA.

B) Marquage de sonde ADN double brin par le ³²P (Kit Multiprime, Amersham)

25 ng (volume < 25 µL) d'insert sont dénaturés 10 mn à 95°C puis transférés rapidement sur glace. Le marquage est effectué par 2,5 U de Klenow selon la méthode du "random hexamers priming" (Sanger, Nicklen *et al.*, 1977) en présence de $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP à température ambiante pendant 2 h. Les hexamers et l'ensemble des réactifs sont fournis par le kit "multiprime" d'Amersham. La réaction est arrêtée par addition de TE. Les nucléotides libres sont éliminés par précipitation à l'éthanol 1 h à -20°C. Après lavage à l'éthanol 70%, la sonde est reprise en TE et le marquage est évalué par le comptage d'un aliquot. La sonde est à nouveau dénaturée 10 mn à 95°C avant hybridation.

XVI) SYSTEMES DE REVELATION D'ACIDES NUCLEIQUES MARQUES

A) Révélation par chimioluminescence

(Kit Photogene Nucleic Acid Detection System, BRL)

Après transfert du matériel nucléique biotinilé, la membrane de nylon est lavée 1 mn dans une solution TBS-Tween 20 à raison de 1 mL/cm² puis incubée sous agitation pendant 1 h à 65°C dans 0,75 mL/cm² d'une solution de saturation de BSA à 3% (BSA pasteurisée, Sigma ; solution filtrée sur un filtre Millex-GS de porosité 0,45 µm, Millipore). Le tube du conjugué streptavidine-phosphatase alcaline (S-PA) est microcentrifugé pendant 4 mn à température ambiante puis le surnageant est dilué au 1/1000 dans la solution TBS-Tween 20 à raison de 7 µg/mL/100 cm² final. La membrane est incubée dans la préparation de S-PA 10 mn à température ambiante sous agitation douce. Cette étape permet la formation d'un complexe ADN-Biotine-(S-AP.). Celle-ci est ensuite lavée 2 fois 15 mn dans la solution de TBS-Tween 20, puis incubée 1 h à température ambiante dans la solution tampon 1x fournie dans le kit à raison de 1 mL/cm². La membrane est égouttée sur papier watman 3 mM pour éliminer l'excédent de tampon. La membrane est ensuite mise dans une pochette de révélation "Photogene" dans laquelle on déposera face ADN 0,01 mL/cm² de solution de substrat : 4-methoxy-4-(3-phosphatphenyl) spiro (1,2 dioxetane-3,2'-adamantane) (= PPD). On chassera d'éventuelles bulles avant de sceller hermétiquement. Après 20 mn de réaction en chambre noire, l'apparition de produits de décompositon du substrat tels que le dioxetane déphosphorylé s'accompagne d'émission de lumière pouvant imprégner un film autoradiographique (film X-OMAT, Kodak). Le temps de contact entre la membrane et le film dépend de la quantité de matériel à détecter et varie de quelques minutes à une heure. Au delà d'une heure, le bruit de fond devient de plus en plus important et ne permet plus l'exploitation du document. Après révélation en chimioluminescence, la membrane de nylon peut être hybridée à l'aide d'une sonde radioactive et devra, dans ce cas, elle devra être lavée 1 h à 70°C dans une solution 0,1% SDS.

B) Hybridation à l'aide d'une sonde nucléotidique ³²P

1) Sonde oligonucléotide 5' ³²P

La préhybridation est effectuée 1 h à 45°C dans la solution d'hybridation. Une fois la sonde ajoutée dans ce même milieu, la membrane est incubée une nuit à 45°C puis

lavée 2x 30 mn à 55°C en 6x SSC, 0,1% SDS, et ensuite rincée plusieurs fois en 0,1% SDS à température ambiante. La température d'hybridation T est calculée en fonction de la température de fusion T_m ($T = T_m - 15^\circ\text{C}$). La membrane égouttée est autoradiographiée à -80°C (film X-OMAT, Kodak) en présence de deux écrans amplificateurs.

2) Sonde ADN double brin ³²P

La membrane est préhybridée 1 h à 45°C, dans la solution d'hybridation. Avant d'être ajoutée au milieu d'hybridation, la sonde est dénaturée soit par chauffage 10 mn à 95°C soit par addition de 500 µL d'une solution de soude à 0,4 N, puis immédiatement refroidie dans la glace. Après incubation une nuit à 45°C, la membrane est lavée 2 fois 15 mn à température ambiante, puis 2 fois à 65°C dans une solution 0,5 SSC et 0,1% SDS. La membrane est égouttée puis autoradiographiée.

C) Déhybridation d'une membrane de nylon

La membrane de nylon est déhybridée 30 mn à 45°C dans une solution NaOH 0,4 N puis lavée plusieurs fois à température ambiante ou 30 mn à 45°C dans la solution de neutralisation. La membrane peut alors être de nouveau hybridée. Egouttée puis scellée dans un sac de congélation, elle sera stockée à 4°C.

XVII) CONSTRUCTION DE MOLECULES ETALON (PCR QUANTITATIVE)

A) Construction d'une molécule étalon polyspécifique (PCR quantitative sur ADN)

L'objectif était d'obtenir une molécule d'ADN double brin possédant les mêmes séquences que celles présentes au niveau de l'ADN génomique du parasite qui servirait d'étalon pour l'amplification d'une cible donnée. Elle doit également générer, pour un même couple d'amorces, un produit d'amplification physiquement séparable sur un gel d'agarose de celui obtenu à partir de l'ADN génomique cible. Nous avons également décidé de regrouper sur une molécule unique les séquences complémentaires des différents couples d'amorces sélectionnés. Ainsi, en exploitant la notion d'amorces aux

extrémités 5' flottantes décrites par HO (HO *et al.*, 1989), il était possible de construire une telle molécule étalon.

Le principe de la PCR par extension d'amorces repose sur l'utilisation d'amorces constituées dans leur partie 5' de la séquence nucléotidique de l'amorce d'un gène cible et dans leur partie 3' de la séquence nucléotidique complémentaire du vecteur de clonage mais aussi, sur une succession de réactions d'amplification génique, chacune utilisant comme matrice d'ADN le produit spécifique issu de la précédente réaction d'amplification. C'est uniquement lors de la première réaction d'amplification que l'ADN plasmidique est utilisé. A chaque étape PCR, sont nécessaires au moins trois cycles pour obtenir la nouvelle molécule d'ADN bicaténaire contenant les séquences nucléotidiques supplémentaires. Ainsi, au premier cycle et pour la première étape, après dénaturation de la matrice plasmidique de départ et hybridation des amorces dans la partie homologue (portion 3'), la Taq polymérase synthétisera le brin complémentaire à partir de chaque extrémité des amorces. Au deuxième cycle, les nouveaux brins d'ADN formés comporteront dans leur extrémité 5' la séquence à intégrer et serviront de matrice à la synthèse d'un brin complémentaire à partir de l'hybridation d'un deuxième jeu d'amorces. Le nouveau brin formé possédera l'une de ses extrémités sous forme monocaténaire. Le troisième cycle permettra d'obtenir l'ADN double brin complet. La molécule résultante s'est ainsi rallongée au niveau de ses extrémités d'une longueur en base équivalente à la somme des deux séquences nucléotidiques non homologues au plasmide de départ constituant les extrémités 5' flottantes des deux amorces.

B) Construction d'une molécule étalon (PCR quantitative sur ARN)

Le but est d'obtenir une molécule d'ADN double brin plasmidique quasi identique en séquence à l'ARNm que l'on veut quantifier, la différence devant porter sur moins de 10 pb en terme de taille de produits PCR. Pour cela, on modifie un site de restriction de l'ADNc cloné.

Ainsi, 10 µg de plasmide recombinant sont digérés à température optimale en trois étapes successives de 30 mn dans un volume final de 15, 20 puis 30 µL en tampon 1x en présence de 200 ng final de RNase A par 30 unités finales d'enzyme de restriction à coupure cohésive. Après arrêt de la réaction, l'enzyme est éliminée par extractions phenol/chloroforme saturé en TE 10.1, puis l'ADN est précipité. Le culot plasmidique est ensuite repris dans 50 µL d'eau PPI. L'analyse d'un aliquot sur minigel d'agarose permet de quantifier le plasmide et de vérifier l'absence de digestion partielle.

Afin de combler les extrémités 5' cohésives, 1 µg du plasmide ainsi linéarisé est incubé 1 h à 37°C en présence de 4 unités d'enzyme de Klenow (Boehringer Mannheim) dans un mélange réactionnel de volume final 20 µL et constitué d'une solution équimolaire de quatre désoxynucléotides à 0,125 mM chacun dans d'une solution tampon 1x. L'enzyme est inactivé à 70°C pendant 10 mn. Après élimination des protéines par extraction phenol/chloroforme et précipitation du plasmide linéarisé, le culot d'ADN est repris dans 20 µL de TE 10.1. L'ADN est ensuite reliqué sur lui même puis introduit dans des bactéries compétentes XL1-Blue par électroporation. Les colonies sélectionnées positives contiennent un plasmide qui présente un site de restriction modifié qui n'est plus digérable par l'enzyme.

XVIII) PCR QUANTITATIVE SUR ADN

A) Constitution d'une gamme étalon

A partir d'une préparation d'ADN plasmidique purifié sur gradient de CsCl, une gamme de dilutions successives, de 10 en 10 puis de 5 en 5 pour les dilutions correspondant à la phase exponentielle, est constituée.

B) Conditions préalables d'amplification dans ce système de PCR quantitative

Dans un premier temps, une PCR initiale réalisée dans les mêmes conditions que la PCR quantitative permet d'une part de rechercher la dilution d'ADN génomique correspondant à la phase exponentielle de la réaction d'amplification et d'autre part de déterminer le point à l'extinction de la bande (révélation au BET).

La matrice d'ADN correspond à un mélange constitué de 5 µL d'une des dilutions du standard et de 5 µL de la dilution prédéterminée d'ADN à quantifier pour un volume final réactionnel de 50 µL. De plus, dans ce modèle d'étude, une des deux amorces est biotinylée au niveau de son extrémité 5'.

Après séparation sur un gel d'agarose NueSieve 3% et transfert sur une membrane de nylon (Hybond-N, Amersham), les produits d'amplification sont révélés par chimioluminescence. L'intensité des bandes présentes sur l'autoradiographie est

mesurée sur chromoscan 3 (Joyce Loeb) équipé d'un filtre rouge (626 nm) et d'une ouverture de fente de 1,5 mm. Le balayage du faisceau lumineux s'effectue pour une bande donnée, dans le sens des deux largeurs. La valeur de l'aire des pics obtenue à partir du calcul de leur intégration est ainsi, corrélée à l'intensité des bandes. Le rapport R (valeur intégrale standard)/valeur intégrale inconnue) correspondant aux différents points de la gamme de dilution est alors calculé. Après avoir reporté sur un graphe log (R) en fonction de log (valeur de dilution de la gamme), la droite résultante de l'alignement des différents points de la courbe est tracée. La quantité d'ADN inconnue est alors déterminée par rapport à la valeur de dilution du standard pour le rapport $R = 1$.

XIX) COLORATION DE KYSTES

Des souris infectées par voie intrapéritonéale depuis plus d'un mois sont sacrifiées par dislocation cérébrale. Chaque cerveau prélevé est repris dans 1 mL de PBS puis broyé à l'aide d'un piston (Piston pellet bleu, Poly Labo) à usage unique dans un microtube de 1,5 mL. 100 μ L d'homogénat sont étalés sur une lame de verre puis séchés quelques minutes à l'air libre. Le matériel biologique est ensuite coloré selon une variante rapide de la coloration de May-Gründwald-Giemsa décrits par le fournisseur (kit RAL 555, Réactif RAL). Les kystes repérés à l'aide d'un microscope photonique (Axioskop, Zeiss), sont photographiés (chambre photomicrographiques MC 80, Zeiss).

RESULTATS

I) DIAGNOSTIC DE LA TOXOPLASMOSE PAR BIOLOGIE MOLECULAIRE : INTERET DE LA TECHNIQUE "PCR"

La technique "PCR" associée à une technique de révélation spécifique de l'ADN permet de mettre en évidence, dans un échantillon, la présence d'un fragment d'ADN dont les caractéristiques physicochimiques dépendent des amorces utilisées. La grande sensibilité et la spécificité de la "PCR" permettent d'envisager son utilisation dans le diagnostic précoce de certaines maladies parasitaires et tout particulièrement dans le cas de la toxoplasmose. Sans conteste, elle peut être un atout considérable pour la détection de parasites, via leur ADN, présents en très faible quantité dans les échantillons biologiques analysés.

Nous avons donc recherché à mettre au point un diagnostic de la toxoplasmose par amplification génique associé à un système de révélation par chimioluminescence. Nous avons parallèlement entrepris la recherche de gènes fortement répétés, spécifiques du génome de *Toxoplasma gondii*, dans l'hypothèse où la sensibilité du test diagnostique serait augmentée par la répétition même de la cible génomique à détecter.

A) Recherche de séquences génomiques répétées spécifiques de l'espèce *Toxoplasma gondii*

Nous avons élaboré un certain nombre de stratégies visant à rechercher une cible d'amplification spécifique de l'espèce *Toxoplasma gondii* et correspondant à des gènes hautement répétés. Nous avons donc, à partir de l'état des connaissances des gènes de *Toxoplasma gondii*, envisagé 3 stratégies reposant sur les données suivantes :

- hypothèse de l'existence de gènes répétés en tandem, mais jusqu'ici non répertoriés dans l'espèce *Toxoplasma gondii*.
- gènes décrits et répétés pour une majorité d'espèces vivantes et de ce fait pouvant être également répétés dans l'espèce *Toxoplasma gondii*. Dans notre étude, nous en avons délibérément sélectionné deux, le gène histone H4 et le gène ARNr 5S.
- existence d'un gène de *Toxoplasma gondii* décrit dans la littérature pour être répété.

1) Séquences d'ADN répétées en tandem

Pour mettre en évidence d'hypothétiques séquences répétées en tandem, nous avons séparé les produits d'ADN génomique de *Toxoplasma gondii* (souche RH) digérés

par une panoplie d'enzymes de restriction et avons, après coloration du gel d'agarose au BET, recherché une bande distincte et repérable dans la trainée de migration. Quinze enzymes ont ainsi été testés (figure 11).

A la différence de l'ADN génomique de souris digéré par EcoR I (figure 11, piste 3) qui fait apparaître une bande d'environ 1300 pb, sur aucune des pistes la digestion de l'ADN génomique de *Toxoplasma gondii* n'a permis de montrer un renforcement d'intensité du BET par rapport à la trainée obtenue. Le témoin d'ADN non digéré (figure 11, piste 1) permettait de vérifier l'état non dégradé de l'ADN génomique de *Toxoplasma gondii* avant digestion.

2) Clonage de gènes connus pour être hautement répétés (histone H4 et ARNr 5S)

Pour cloner un gène dont le degré de répétition est connu et élevé dans de nombreuses espèces animales, nous avons appliqué sur le génome de *Toxoplasma gondii* une stratégie PCR utilisant un couple d'amorces "consensus". Nous devions déterminer la séquence de ces amorces à partir de séquences déjà connues et publiées. Après alignement de ces séquences, nous avons recherché les régions les plus conservées et nous avons déterminé une séquence consensus en choisissant les bases les plus représentées sur l'ensemble des espèces et les plus fréquentes parmi les espèces les plus proches phylogénétiquement de l'espèce *Toxoplasma gondii*. Nous avons également recherché à introduire un site de restriction au niveau de l'extrémité 5' de chacune des amorces pour faciliter secondairement le clonage des fragments. Notre choix s'est porté sur deux gènes très conservés au cours de l'évolution et connus pour être hautement répétés dans les génomes eucaryotes : les gènes d'histone H4 et d'ARNr 5S. Nous avons préféré sélectionner le gène histone H4 au détriment des gènes histones H2A et H2B parce que la protéine H4 est parmi les protéines les plus conservées au cours de l'évolution. Ces séquences peuvent même être quasi-identiques dans des espèces aussi éloignées que la vache et le pois (Alberts *et al.*, 1995). Par contre, les protéines H2A et H2B présentent une variation interspèce non négligeable. Le choix entre H3 et H4 a reposé plutôt sur des critères phylogéniques. En effet, dans le cas du gène histone H4, deux séquences d'espèces phylogénétiquement proches de *Toxoplasma gondii* étaient connues : *Oxytricha nova* et *Tetrahymena thermophila* (Johnson et Baversstock, 1989) au lieu d'une seule dans le cas du gène histone H3 (*Tetrahymena thermophila*).

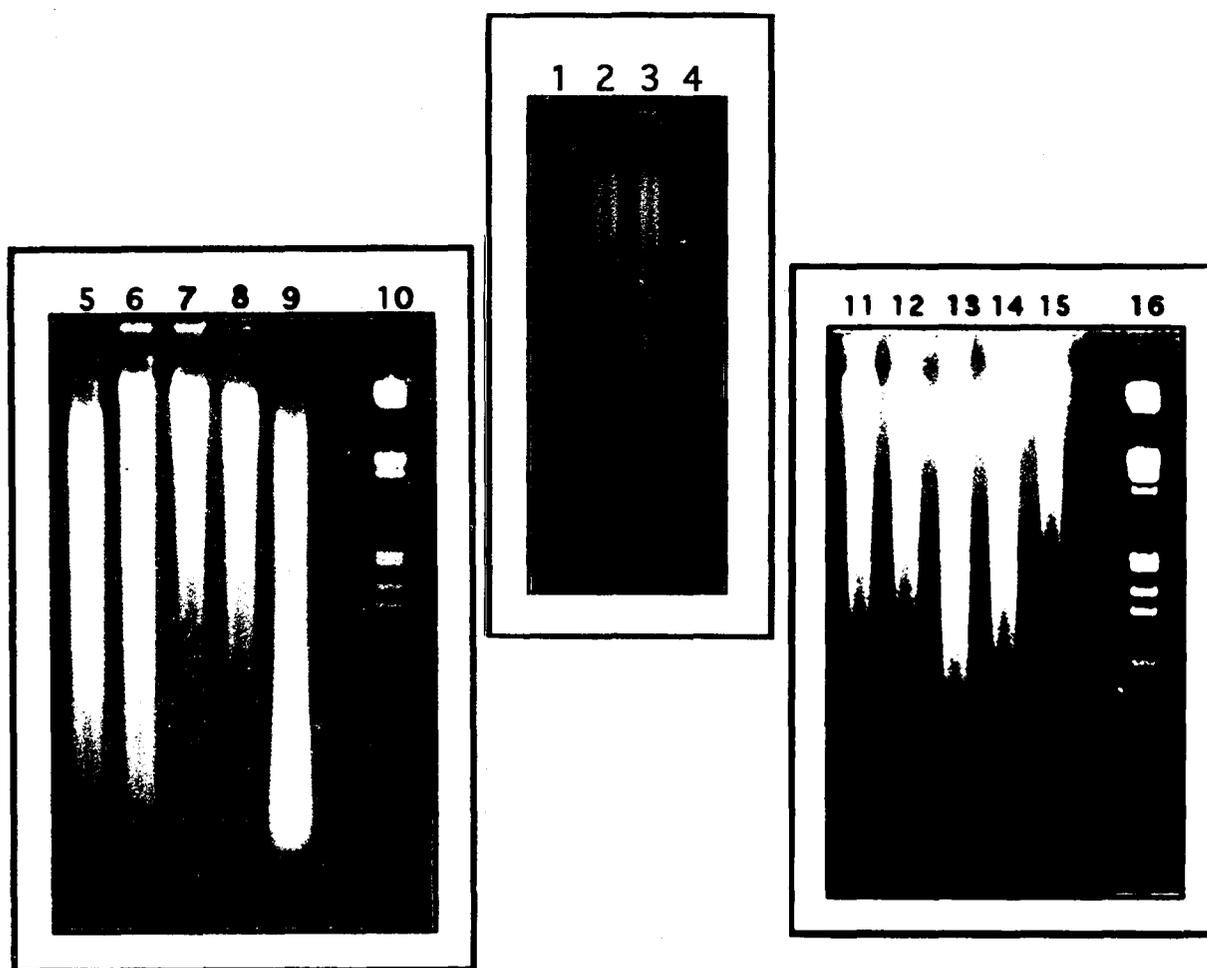


Figure 11 : Digestion d'ADN génomique par une panoplie d'enzymes de restriction

Après digestion pendant 3 h à température optimale (variable selon les enzymes) de 10 μ g d'ADN génomique de tachyzoïtes (souche RH) purifié sur double gradient de CsCl, les produits sont séparés sur gel d'agarose 1,2% en TAE 1x et sous ampérage constant de 35 mA. Les produits colorés au BET sont visualisés sous UV (260 nm).

- | | |
|--|--------------------------------------|
| piste 1 : ADN non digéré | piste 2 : Digestion EcoR I (30 u) |
| piste 3 : ADN génomique de souris OF1 digéré par EcoR I (30 u) | |
| piste 4 : 10 et 16 : Poids moléculaire III (Boehringer mannheim) | |
| piste 5 : Digestion Acc I (15 u) | piste 6 : Digestion Ava I (15 u) |
| piste 7 : Digestion BamH I (30 u) | piste 8 : Digestion Sac I (30 u) |
| piste 9 : Digestion Taq I (30 u) | piste 11 : Digestion Cla I (30 u) |
| piste 12 : Digestion EcoR V (30 u) | piste 13 : Digestion Hind III (30 u) |
| piste 14 : Digestion Sal I (30 u) | piste 15 : Digestion Xba I (30 u) |

a) Gène histone H4

- Amplification de l'ADN génomique

Dans le cas de la stratégie du gène histone H4, la première étape a consisté en la détermination de la séquence des amorces consensus (figure 12). Nous avons donc sélectionné plusieurs séquences connues du gène histone H4 dans différentes espèces dont deux phylogénétiquement proches de *Toxoplasma gondii* (*Oxytricha nova* et *Tetrahymena thermophila*). Pour faire apparaître après alignement, les régions les plus conservées, nous avons également choisi les régions codantes correspondant à des séquences d'espèces plus éloignées (*Arabidopsis thaliana* : plante, *Saccharomyces cerevisiae* : champignon, *Strongylocentrotus purpuratus* : invertébré, *Mus musculus* et *Homo sapiens* : vertébrés). De même, pour visualiser les bases variables intraespèces, nous avons recherché pour chaque espèce deux séquences appartenant soit à un genre identique (*Strongylocentrotus purpuratus*) soit à un genre différent (*S. cerevisiae* et *S. carlsbergensis*) mais présentant au moins quelques différences. Pour identifier les produits après amplification, par hybridation spécifique, nous avons déterminé, selon les mêmes critères, une sonde consensus (S H4).

L'amplification d'ADN génomique chez les espèces où le gène est déjà cloné devait permettre de localiser physiquement le produit PCR attendu (figure 13). Nous avons pour cette raison utilisé de l'ADN génomique provenant d'espèces dont la séquence du gène histone H4 était publiée (rat, souris et homme). Nous avons également amplifié de l'ADN génomique disponible dans notre laboratoire et correspondant cette fois-ci à des espèces dont le gène histone H4 était inconnu (*Plasmodium falciparum*, *Schistosoma mansoni*, ..). Il s'agissait ensuite de cloner les produits d'amplification correspondant à la région codante du gène. Après séquençage, le but était de sélectionner un couple d'amorces au niveau des régions les plus divergentes (codantes ou non codantes) entre les différentes espèces pour obtenir un maximum de spécificité vis-à-vis de *Toxoplasma gondii*.

L'analyse des profils obtenus par amplification d'ADN génomique d'espèces différentes à partir du couple d'amorces 5' H4 et 3' H4 est présentée en figure 13. Les amplifications d'ADN génomique issu de *Plasmodium falciparum*, de Souris OF1, de Rat Fisher ou de *Schistosoma mansoni* (dans l'ordre figure 13 A, pistes 4, 9 et 10 et figure 13 B, piste 2) ont produit un fragment PCR de taille comprise entre 280 et 290 pb (taille attendue chez la souris et le rat) et nettement majoritaire dans le cas de *Plasmodium falciparum* et du rat (piste 4 et piste 10). L'amplification d'ADN génomique

Figure 12 : Détermination des amorces consensus et d'une sonde oligonucléotide correspondant au gène histone H4

Les nombres indiqués dans les tableaux correspondent à la position des extrémités des séquences publiées. Le dernier nombre en bas à droite de chacun des trois tableaux indique la taille en base des différents oligonucléotides consensus. Chacune des deux amorces possède comme site de clonage, le site de restriction EcoR I. La taille moyenne attendue du fragment PCR est de 291 pb. Les séquences utilisées dans cette étude ont été extraites de la banque de donnée Genbank/EMBL. Ainsi les références correspondant aux espèces allant d'*Oxytrycha nova* à *Homo sapiens* sont respectivement M24411, X04755, X00417, X06641, X06639, M17133, M17132, X00724, K03154, X13236, X13235, M24020, M27433, M16707 ET X00038.

| Espèce | 5' | Séquence d'ADN | 3' |
|--------------------------------------|------|--------------------------------------|------|
| <i>Oxytricha nova</i> | 1205 | ACGGAAAAGTTGGTGCCAAGAGACAC | 1230 |
| <i>Tetrahymena thermophila</i> | 369 | TG--T--G--C--A----- | 394 |
| <i>Tetrahymena thermophila</i> | 914 | TG--T-----C--A----- | 939 |
| <i>Strongylocentrotus purpuratus</i> | 288 | T-----G-GA--C-----C-T--T | 313 |
| <i>Strongylocentrotus purpuratus</i> | 228 | T-----G-GA--C-----C-T--T | 953 |
| <i>Arabidopsis thaliana</i> | 639 | TG--T---GA--A-----C-T-- | 664 |
| <i>Arabidopsis thaliana</i> | 624 | GA-----G-TTG-GT---G--GGA | 649 |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 1293 | TA--T---G-----C-T--- | 1318 |
| <i>Saccharomyces carlsbergensis</i> | 214 | TA-----G-----C-T--- | 239 |
| <i>Mus musculus</i> | 691 | TG--C---G---C--T---C-C--T | 716 |
| <i>Mus musculus</i> | 265 | TT--G---GC--C--T---C-C--- | 290 |
| <i>Rattus rattus</i> | 221 | TT--G---G---C--T---C-T--T | 246 |
| <i>Rattus norvegicus</i> | 221 | TT--G---G---C--T---C-T--T | 246 |
| <i>Homo sapiens</i> | 644 | TA--C---GG--C--T---C-C--- | 669 |
| <i>Homo sapiens</i> | 272 | TA--C---G---C--T---C-C--- | 297 |
| Séquence consensus amorce 5' H4 | 1 | TGGGAGAAATTCGGAGCCAAGAGACAC EcoRI | 26 |

| Espèce | 5' | Séquence d'ADN | 3' |
|--|------|---------------------------------------|------|
| <i>Oxytricha nova</i> | 1471 | TACGGTTTCGGTGGATGAAGTTCCTACT | 1498 |
| <i>Tetrahymena thermophila</i> | 635 | --T-----T----AAA-T--AA | 662 |
| <i>Tetrahymena thermophila</i> | 1180 | --T-----T----CAAAA--T- | 1207 |
| <i>Strongylocentrotus purpuratus</i> | 551 | -----A-----A---AAGTG--- | 577 |
| <i>Strongylocentrotus purpuratus</i> | 491 | -----A-----A-T---AAGT--- | 517 |
| <i>Arabidopsis thaliana</i> | 902 | -----A-----C-T---AAGG-TT- | 928 |
| <i>Arabidopsis thaliana</i> | 899 | -----A-----T---T-AGAGTT- | 925 |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 1556 | -----T-A-TT-AG--A- | 1583 |
| <i>Saccharomyces carlsbergensis</i> | 477 | --T-----T-A--CAAT-GGTG | 504 |
| <i>Mus musculus</i> | 954 | -----A-----G-T---GGA---GA | 980 |
| <i>Mus musculus</i> | 528 | -----A-----C-T---TCGA---AC | 554 |
| <i>Rattus rattus</i> | 484 | -----C-----T---AC-G---A- | 510 |
| <i>Rattus norvegicus</i> | 484 | -----C-----T---AC-G---A- | 510 |
| <i>Homo sapiens</i> | 907 | -----C-----A-C--G-C G-CG-- | 932 |
| <i>Homo sapiens</i> | 535 | -----C-----A-C--G-CCG-CG-- | 561 |
| Séquence consensus amorce 3' H4 | 1 | TACGGTTTCGGTGGATGAA.TTCCTACT EcoRI | 27 |
| Séquence consensus complémentaire amorce 3' H4 | | AGTAGGAA.TTCATCCACCGAAACCGTA EcoRI | |

| Espèce | 5' | Séquence d'ADN | 3' |
|--------------------------------------|------|--|------|
| <i>Oxytricha nova</i> | 1387 | GTCACCTACACTGAACACGCCAAGAGAAAGACCGT CAC | 1424 |
| <i>Tetrahymena thermophila</i> | 551 | --T--T-----GA----- | 588 |
| <i>Tetrahymena thermophila</i> | 1096 | -----T-----T-GA-----A----- | 1133 |
| <i>Strongylocentrotus purpuratus</i> | 467 | -----TGC--G-----G----- | 504 |
| <i>Strongylocentrotus purpuratus</i> | 407 | -----TGC--G-----G----- | 444 |
| <i>Arabidopsis thaliana</i> | 818 | -----G-----A-G--G-----T----- | 855 |
| <i>Arabidopsis thaliana</i> | 815 | -----T-----C-G-----T-G--G-----T--G-- | 852 |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 1472 | --T--T-----T-----T--T-- | 1509 |
| <i>Saccharomyces carlsbergensis</i> | 393 | --T--T-----C-----T--T-- | 430 |
| <i>Mus musculus</i> | 870 | -----G--G-----C-C----- | 907 |
| <i>Mus musculus</i> | 444 | -----G--G-----C-C----- | 481 |
| <i>Rattus rattus</i> | 400 | -----G--G-----C-C-----G----- | 437 |
| <i>Rattus norvegicus</i> | 400 | -----G--G-----C-C-----G----- | 437 |
| <i>Homo sapiens</i> | 823 | -----C--G-----C-C----- | 860 |
| <i>Homo sapiens</i> | 451 | -----C--G-----C-C----- | 488 |
| Séquence consensus sonde S H4 | 1 | GTCACCTTACACTGAACACGCCAGGAGAAAGACCGT CAC | 38 |

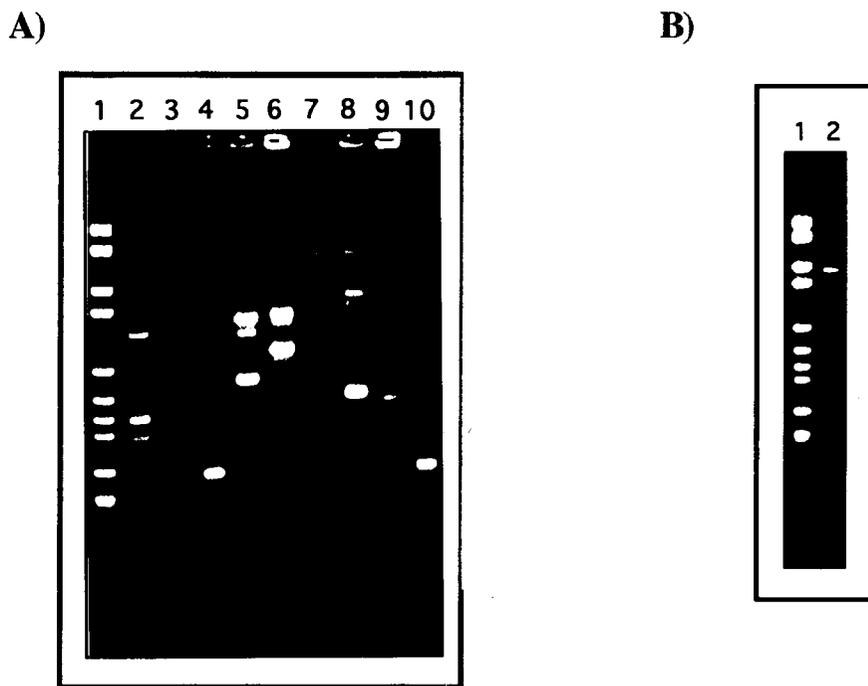


Figure 13 : Amplification d'ADN génomique de différentes espèces à partir du couple d'amorces (5' H4 et 3' H4)

Chaque réaction d'amplification est réalisée sur 1 µg d'ADN génomique comme décrit dans le matériel et méthodes à savoir pour chacun des 35 cycles, 1 mn à 94°C de dénaturation, 30 s à 45 °C d'appariement et 1 mn à 72°C d'élongation. 1/10 du produit réactionnel est séparé sur un gel d'agarose 2% en TBE 1x.

- A)**
- | | |
|---|---|
| piste 1 : Poids moléculaire III (Boehringer mannheim) | piste 2 : <i>Toxoplasma gondii</i> (RH) |
| piste 3 : Témoin négatif (absence de matrice) | piste 4 : <i>Plasmodium falciparum</i> |
| piste 5 : <i>Leishmania chagasi</i> | piste 6 : <i>Trypanosoma cruzi</i> |
| piste 7 : <i>Schistosoma mansoni</i> | piste 8 : Eosinophiles humains |
| piste 9 : Souris OF1 | piste 10 : Rat Fisher |
- B)**
- | |
|---|
| piste 1 : Poids moléculaire III (Boehringer mannheim) |
| piste 2 : <i>Schistosoma mansoni</i> (deuxième essai) |

de *Toxoplasma gondii* (figure 13 A, piste 2) a généré une bande de 270 pb parmi d'autres bandes de taille supérieure à 300 pb. Ceci indique que le couple d'amorces choisi a engendré, dans ces conditions d'amplification peu stringentes, des fragments PCR non spécifiques. Les amplifications d'ADN génomique issu de *Leishmania chagasi*, de *Trypanosoma cruzi* ou de cellules polynucléaires humaines (figure 13 A, pistes 5, 6, et 8) ont donné des bandes mais pas à la taille attendue (288 pb dans le cas de l'ADN humain). L'amplification d'ADN génomique de *Schistosoma mansoni* (figure 13 B, piste 2) a permis d'obtenir un fragment de taille attendue.

L'analyse en gel d'acrylamide des fragments PCR est illustrée sur la figure 14. L'amplification d'ADN génomique de *Toxoplasma gondii* à partir du couple d'amorces consensus n'a pas permis d'obtenir de bande unique, par contre, l'ADN de *Plasmodium falciparum* a généré un fragment PCR majoritaire de taille attendue. En effet, la taille du fragment estimée à 280 pb est proche de la taille de 291 pb déterminée en théorie d'après les séquences d'autres espèces (figure 14, piste 1). En ce qui concerne l'espèce *Toxoplasma gondii* (figure 14, pistes 2, 3, 4 et 6), plusieurs bandes migrent au niveau de la région équivalente à 280 pb dont une à 270 pb. L'augmentation de la température d'appariement (figure 14, piste 3 et 4) était supposée éliminer en partie les fragments de nature aspécifique. Les pistes 2 et 4 de la figure 4 correspondent à deux "PCR" distinctes, effectuées dans les mêmes conditions mais qui pour des raisons inexplicées donnaient des profils d'intensité différente. En augmentant la température d'appariement à 55 °C (figure 14, piste 5) seule la bande de 780 pb persiste. Si cette bande est issue du gène histone H4 de *Toxoplasma gondii*, on devrait alors admettre que celui-ci possède au moins un intron dans la région d'ADN génomique encadrée par les deux amorces. En résumé, les fragments PCR de 780 et de 270 pb étaient candidats comme gène histone H4 pour l'espèce *Toxoplasma gondii*.

Afin d'établir l'identité des fragments PCR issus d'ADN génomique de *Toxoplasma gondii* et des autres espèces étudiées, les produits d'amplification analysés sur gel d'agarose (figure 13) sont transférés sur membrane de nylon par la technique Southern Blot puis hybridés avec la sonde consensus S H4 (figure 15).

- Identification des produits PCR sur l'ensemble des espèces par hybridation avec une sonde consensus du gène histone H4 (S H4)

Sur l'ensemble des produits d'amplification obtenus pour les différentes espèces, seuls les ADN génomiques de *Plasmodium falciparum* (figure 15 A, piste 4) et de *Schistosoma mansoni* (figure 15 B, piste 1) ont donné un produit PCR reconnu

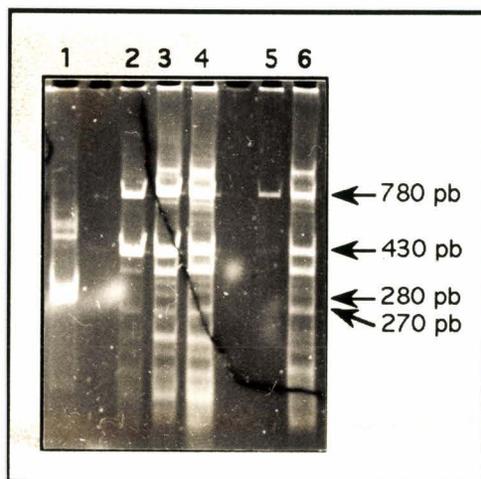


Figure 14 : Variation de la température d'appariement

Les produits réactionnels obtenus après amplification de 1 μ g d'ADN génomique de tachyzoïtes (RH) purifié sur double gradient de CsCl, ont été séparés sur gel d'acrylamide 6%. Les bandes à 430 et 780 pb correspondent à des fragments majoritaires en terme de produits PCR. L'amplification est réalisée sur 45 cycles dans les conditions suivantes : dénaturation 45 s à 94°C, appariement 30 s à une température choisie entre 40 et 55°C et 1 mn à 72°C d'élongation.

piste 1 : *Plasmodium falciparum* (45°C)

piste 3 : *Toxoplasma gondii* (40°C)

piste 5 : *Toxoplasma gondii* (55°C)

piste 2 : *Toxoplasma gondii* (45°C)

piste 4 : *Toxoplasma gondii* (45°C)

piste 6 : *Toxoplasma gondii* (50°C)

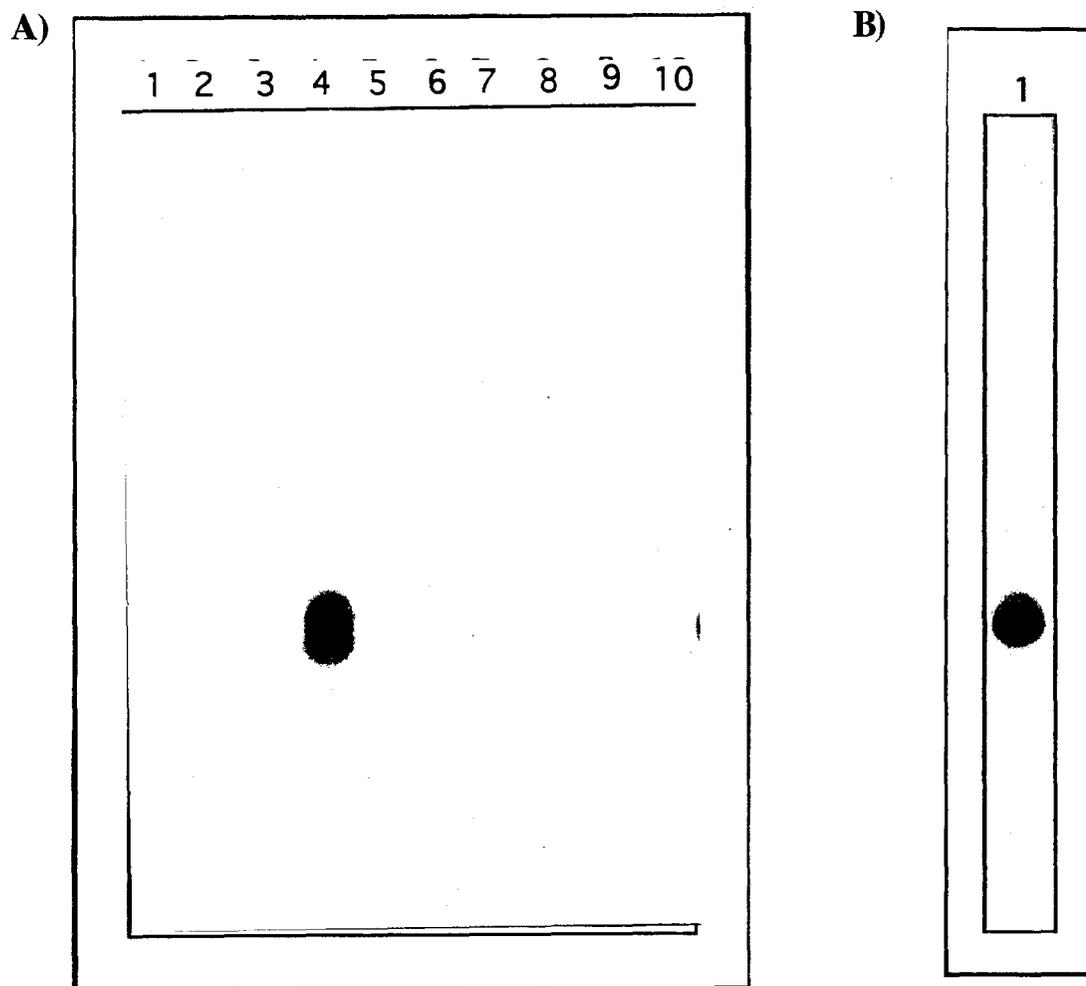


Figure 15 : Southern blot et Hybridation avec la sonde consensus S H4 des produits d'amplification issus de différentes espèces

L'hybridation est effectuée sur la nuit à 42°C en présence d'une sonde oligonucléotidique consensus spécifique du gène histone H4 (S H4) marqué au ^{32}P au niveau de son extrémité 5'. La membrane est lavée à température ambiante 2 h en 6x SSC puis exposée 16 h à -80°C. La bande correspondant à l'amplification d'ADN génomique de *Schistosoma mansoni* est obtenu après 6 h d'exposition à -80°C.

- A)**
- | | |
|---|---|
| piste 1 : Poids moléculaire III (Boehringer mannheim) | piste 2 : <i>Toxoplasma gondii</i> (RH) |
| piste 3 : Témoin négatif (absence de matrice) | piste 4 : <i>Plasmodium falciparum</i> |
| piste 5 : <i>Leishmania chagasi</i> | piste 6 : <i>Trypanosoma cruzi</i> |
| piste 7 : <i>Schistosoma mansoni</i> | piste 8 : Eosinophiles humains |
| piste 9 : Souris OF1 | piste 10 : Rat Fisher |
- B)**
- piste 1 : *Schistosoma mansoni* (deuxième essai)

spécifiquement par la sonde oligonucléotidique consensus. Dans le cas de *Plasmodium falciparum* (figure 15 A, piste 4), nous avons observé un doublet en hybridation. Le fragment de taille attendue (290 pb) qui s'est hybridé le mieux avec la sonde correspond à celui qui était à la limite de détection en BET. Le fragment de 280 pb reconnu également par la sonde mais s'hybridant moins bien, proportionnellement à la quantité d'ADN présent sur le gel d'agarose, pourrait correspondre à une amplification aspécifique.

- Clonage du gène Histone H4 de *Plasmodium falciparum*

Après amplification d'ADN génomique de *Plasmodium falciparum* et après clonage en "TA Cloning" (souche XL-1 Blue transformées par électroporation) des produits PCR résultants, deux clones positifs (Pf2 et Pf3) ont été sélectionnés et séquencés. La spécificité des clones Pf2 et Pf3 pour l'espèce *Plasmodium falciparum* a été confirmée par l'absence d'hybridation sur divers ADN génomiques d'espèces différentes (figure 16). La position des amorces a été replacée par rapport à la séquence complète de l'insert Pf3 (figure 17).

Le fragment Pf3 mesurerait 290 pb si les amorces n'avaient pas été tronquées au cours du clonage. Ce qui signifie que l'insert cloné correspond au fragment "PCR" de 290 pb et non pas à celui de 280 pb (majoritaire en BET). Cette séquence d'ADN, comparée à une banque de données (GenBank) confirme son identité avec le gène histone H4. Le polypeptide résultant est composé de 79 acides aminés (figure 18). Le choix des oligonucléotides consensus ciblant la région codante excluait de la séquence les 18 acides aminés de l'extrémité N terminale et les 5 acides aminés de l'extrémité C terminale. Parmi les 79 acides aminés alignés, 8 seulement diffèrent de la séquence consensus. La position et le nombre des acides aminés chargés positivement sont maintenus même au niveau des acides aminés divergents. Ces observations renforcent l'hypothèse que les protéines histones H4 sont très conservées entre les différentes espèces eucaryotes.

Pour l'espèce *Plasmodium falciparum*, le couple d'amorces a permis de cloner une partie de la séquence du gène correspondant à la protéine histone H4 (79 acides aminés sur 102 probables). Le séquençage (résultat non illustré) des fragments PCR de 270 et 780 pb obtenus après amplification d'ADN génomique de *Toxoplasma gondii* a confirmé qu'il s'agissait de produits PCR aspécifiques. Ce qui signifie que l'utilisation du couple d'amorces consensus (5' H4 et 3' H4) ne permettait pas d'obtenir dans ces conditions d'amplification, le gène histone H4 de *Toxoplasma gondii*. Comme les variations des paramètres d'amplification (figure 14) n'ont pas permis de générer un fragment PCR

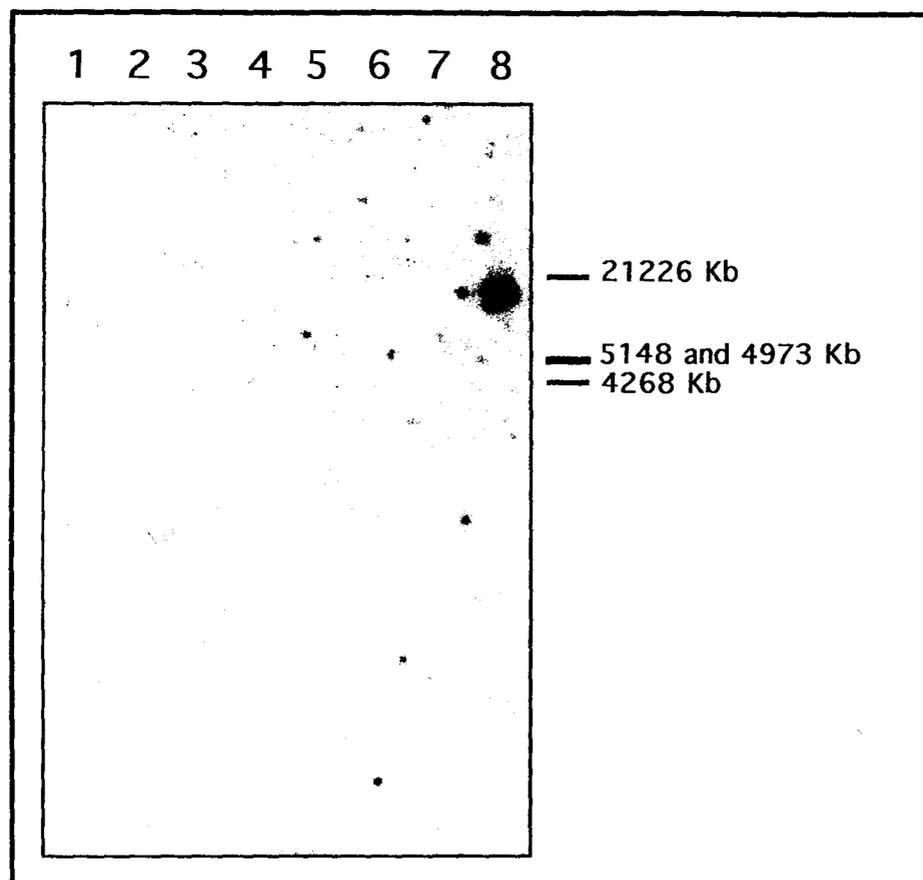


Figure 16 : Southern Blot et hybridation avec la sonde "insert Pf3" d'ADN génomique de différentes espèces préalablement digérés par EcoR I

Pour chaque espèce, l'ADN génomique digéré 5 h à 37°C par 40 U d'endonucléase EcoR I, séparé sur un gel d'agarose à 0,8%, transféré sur membrane de nitrocellulose par la technique de Southern Blot, est hybridé avec la sonde "Insert Pf3" à 42°C pendant 15 h. La sonde d'ADN double brin est marquée au ^{32}P selon la méthode du "random hexamers priming". Après lavage, la membrane est autoradiographiée 7 j à -80°C.

Piste 1 : 5 μg *Schistosoma mansoni*

Piste 3 : 5 μg *Trypanosoma cruzi*

Piste 5 : 4 μg d'ADN de poulet

Piste 7 : 5 μg d'ADN de souris

A droite : Poids moléculaire III (Boehringer mannheim)

Piste 2 : 1,5 μg *Toxoplasma gondii*

Piste 4 : 5 μg d'ADN humain

Piste 6 : 3 μg d'ADN de rat

Piste 8 : 1,5 μg *Plasmodium falciparum*

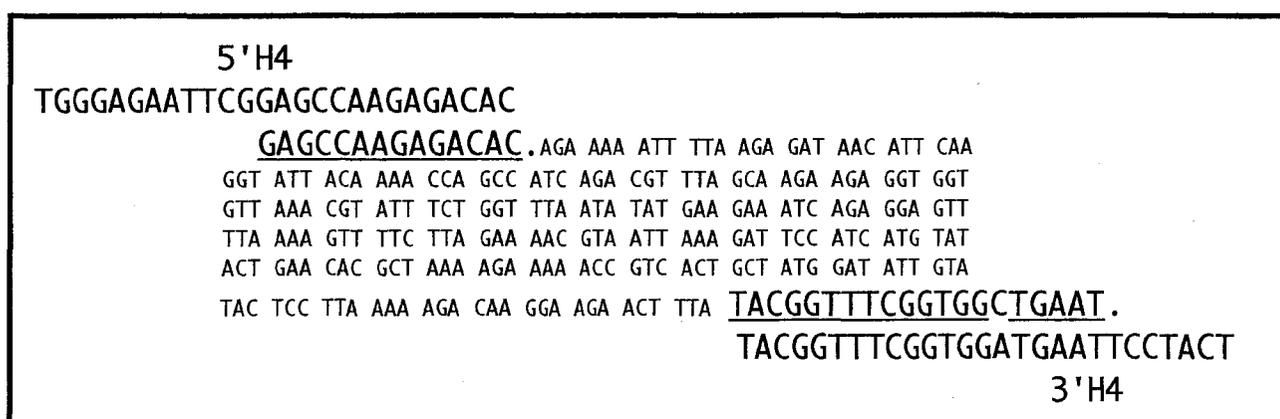


Figure 17 : Localisation des amorces par rapport à la séquence du produit PCR correspondant à l'ADN génomique de *Plasmodium falciparum*

Les séquences soulignées correspondent à la séquence des amorces retrouvées au niveau de l'insert. La base "C" non soulignée au niveau de l'amorce 3' H4, diffère de la base attendue "A". La séquence comprise entre les deux points correspond à celle de l'insert Pf2. 5' H4 et 3' H4 désignent les deux amorces utilisées au cours de l'amplification.

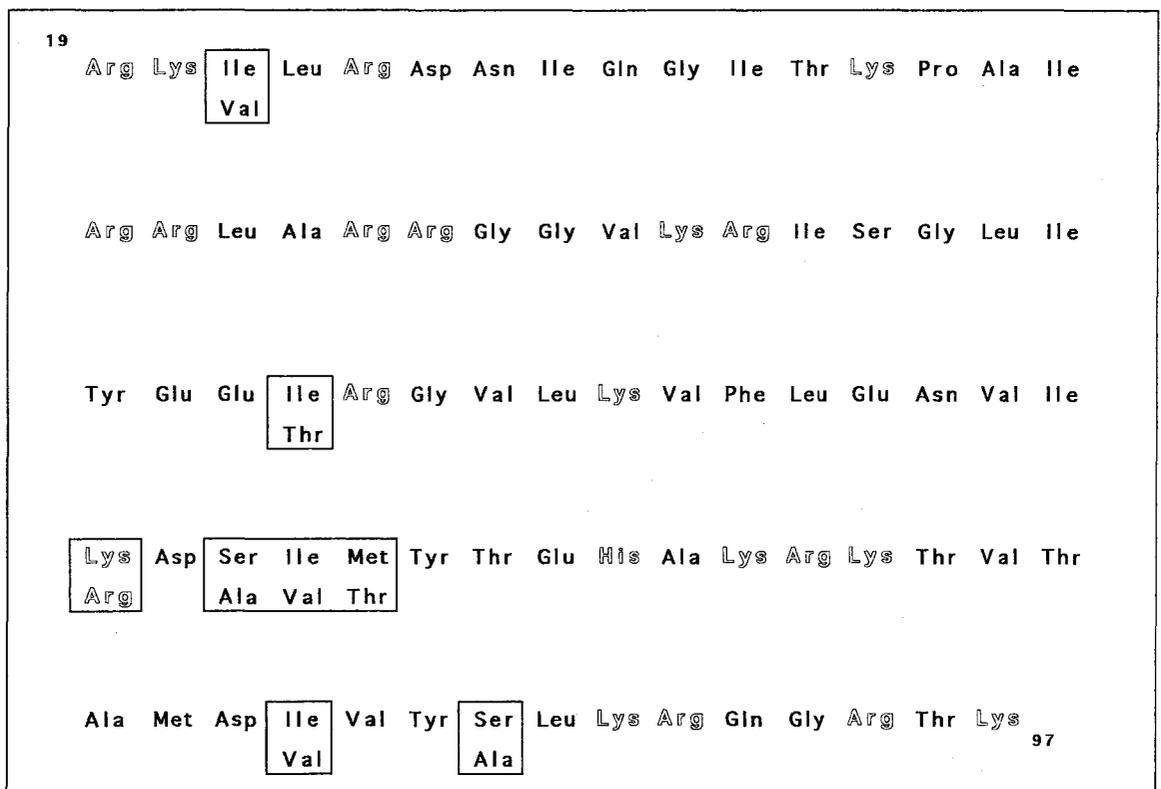


Figure 18 : Comparaison de la séquence d'acides aminés de *Plasmodium falciparum* avec une séquence consensus (Wells et McBride, 1989)

L'alignement est donné entre le 19^{ième} et 97^{ième} acides aminés de la séquence consensus. Les acides aminés chargés positivement sont représentés en caractère "relief". Seuls les acides aminés correspondant à la séquence protéique de *Plasmodium falciparum* et différents de la séquence consensus sont représentés au niveau des encadrements. Les acides aminés des positions 21, 67, 70 et 86 correspondent à des substitutions dites "conservatives".

spécifique du gène histone H4, l'hypothèse la plus simple est de supposer que les séquences des amorces consensus ne présentaient pas suffisamment d'homologie avec la séquence cible de ce gène. Cette hypothèse est renforcée par l'absence de produit PCR attendu chez d'autres espèces telles que le rat.

Ce travail a fait l'objet d'une publication intitulée : "**The partial sequence of the *Plasmodium falciparum* histone H4 gene**" (Beauchamps *et al.*, 1996).

b) Gène ARNr 5S

Chez les eucaryotes, les gènes codant pour le pré-ARNr 45S (ARNr 18, 5,8 et 28S) et l'ARNr 5S sont des gènes répétés en tandem et par conséquent ont représenté une stratégie alternative pour obtenir un gène répété, spécifique de *Toxoplasma gondii*. Leur nombre de copies est variable selon les espèces mais en moyenne le degré de répétition semble plus important pour l'ARNr 5S. Par exemple, dans le cas de l'espèce *Tetrahymena pyriformis*, le nombre de copies d'ARNr 5S est 1,6 fois plus important que celui du gène pré-ARN 45S et 53 fois plus important pour l'espèce *Xenopus laevis*. C'est pourquoi, nous avons choisi d'entreprendre le clonage du gène ARNr 5S de *Toxoplasma gondii*.

Chez la plupart des eucaryotes, l'organisation des gènes ARNr 5S se distingue de celle des gènes principaux d'ARN. Les gènes 5S sont habituellement organisés en un ou plusieurs groupes de gènes répétés en tandem. L'espace non transcrit séparant deux unités de transcription est de longueur variable selon les espèces. Ainsi, pour l'espèce *Drosophila melanogaster*, il ne dépasse pas 250 pb. Cet espace est divergent en séquence d'une espèce à l'autre.

Dans le cas du gène ARNr 5S, notre choix s'est orienté sur le clonage, après "réverse PCR" à l'aide d'amorces consensus (figure 19), de la portion d'ADN séparant deux unités successives de répétition afin de sélectionner secondairement un couple d'amorces à partir des régions les plus divergentes comparativement aux autres espèces. En effet, la petite taille du gène ARNr 5S et le haut degré de conservation de sa séquence entre les espèces ne devait probablement pas permettre de trouver des régions suffisamment divergentes dans le gène pour la détermination d'amorces spécifiques de *Toxoplasma gondii*. Les différentes étapes résumant cette stratégie sont illustrées par la figure 20.

Figure 19 : Détermination des amorces consensus et d'une sonde oligonucléotide correspondant au gène ARN ribosomique 5S

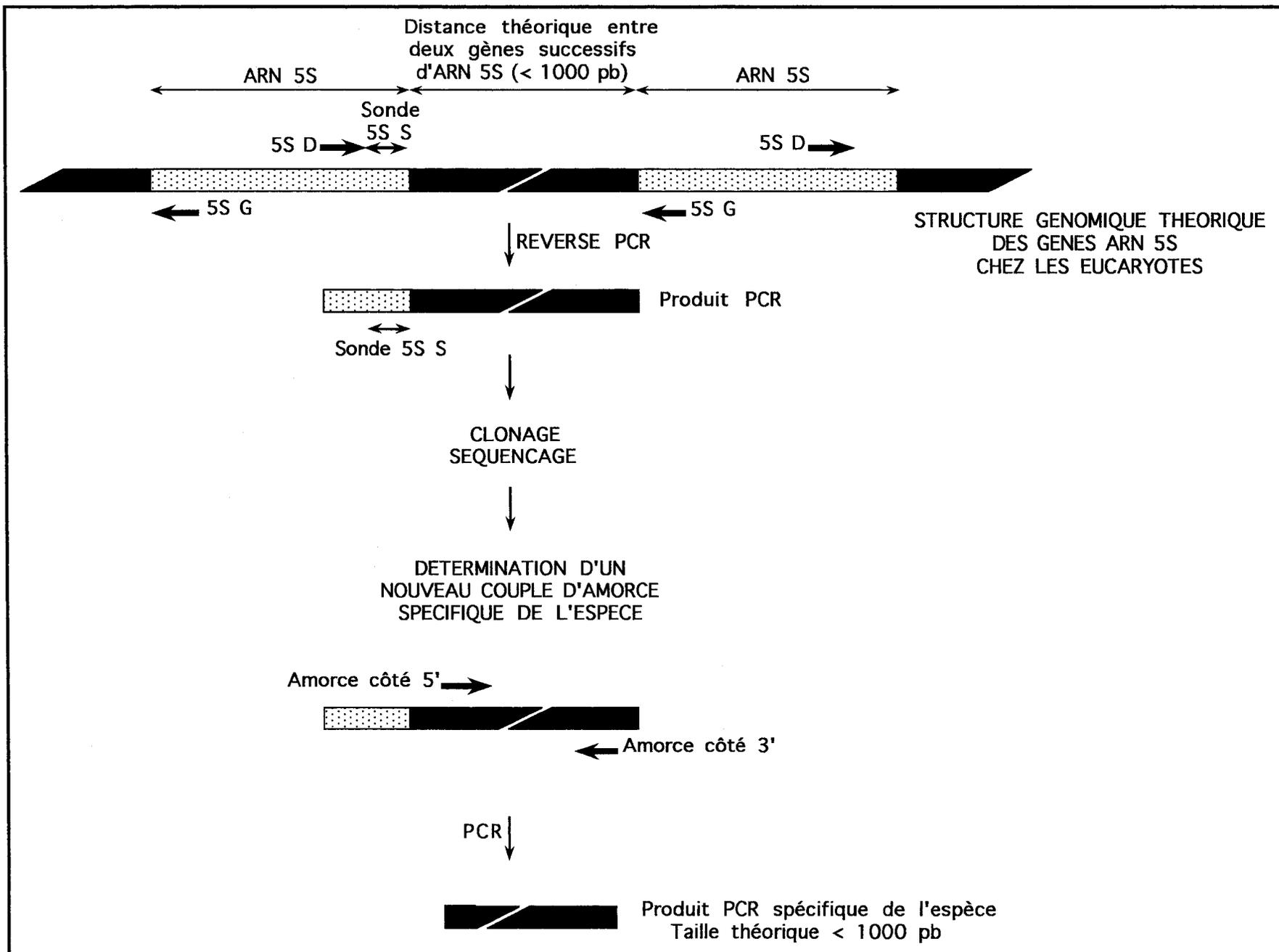
Les nombres indiqués dans les tableaux désignent la position des extrémités des séquences publiées. La taille en base des oligonucléotides consensus est indiquée en bas à droite de chacun des trois tableaux. Les bases en caractère italique correspondent aux bases imposées pour constituer un site de restriction mais absentes au niveau de l'ensemble des séquences sélectionnées. Le site de restriction est souligné. Les séquences utilisées sont extraites de la banque de données Genbank/EMBL. Les références correspondant aux espèces allant d'*Euplotes woodruffi* à *Homo sapiens* sont respectivement K02347, X13718, K02343, J01872, X00475, J01851, K02235, K01594 et J01867.

| Espèce | 5' | Séquence d'ADN | 3' |
|--|-----|--------------------------------------|-----|
| <i>Euplotes woodruffi</i> | 6 | CGGCCATACTAAGCCAAATGCACCGG | 31 |
| <i>Euplotes eurystomus</i> | 242 | ----- | 267 |
| <i>Bresslaua vorax</i> | 6 | -----A----- | 31 |
| <i>Paramecium tetraurelia</i> | 6 | T-----T--A----- | 31 |
| <i>Tetrahymena thermophila</i> | 66 | -----GTG--AA----- | 91 |
| <i>Blepharisma japonicum</i> | 6 | -----T--T--C-----A- | 31 |
| <i>Mus musculus</i> | 52 | -----C-CC-TG--CA----C- | 77 |
| <i>Rattus norvegicus</i> | 6 | -----C-CC-TG--C--G--C- | 31 |
| <i>Homo sapiens</i> | 6 | -----C-CC-TG--C--G--C- | 31 |
| Séquence consensus primer 5S 5' | 1 | CGGCCATACTAAGGCGAATTCACCGG EcoR I | 26 |
| Séquence consensus complémentaire primer 5S 5' | | CCGGTGAATTCGCCTTAGTATGGCCG EcoR I | |

| Espèce | 5' | Séquence d'ADN | 3' |
|---------------------------------|-----|--------------------------------------|-----|
| <i>Euplotes woodruffi</i> | 65 | GGCCTGTTAAGTACTGAGGTGGGGGA | 90 |
| <i>Euplotes eurystomus</i> | 301 | ----- | 326 |
| <i>Bresslaua vorax</i> | 65 | ---A--G-T-----A----- | 90 |
| <i>Paramecium tetraurelia</i> | 65 | ---GA-G-T-----A----- | 90 |
| <i>Tetrahymena thermophila</i> | 125 | ---TG-G-T-----A----- | 150 |
| <i>Blepharisma japonicum</i> | 65 | ---GA-G-T-----TG----- | 90 |
| <i>Mus musculus</i> | 111 | ---A--G-T-----GA----A-- | 135 |
| <i>Rattus norvegicus</i> | 65 | ---G--G-T-----TG-A---A-- | 90 |
| <i>Homo sapiens</i> | 65 | ---G--G-T-----TG-A---A-- | 90 |
| Séquence consensus primer 5S 3' | 1 | GGCCTGGTTAGTACTCAGCTGGGGGA Pvu II | 26 |

| Espèce | 5' | Séquence d'ADN | 3' |
|--------------------------------|-----|------------------------|-----|
| <i>Euplotes woodruffi</i> | 89 | GACCACTCGGGAACCTCAGGTG | 110 |
| <i>Euplotes eurystomus</i> | 325 | ----- | 346 |
| <i>Bresslaua vorax</i> | 89 | ---G--T-----GCC--T--- | 110 |
| <i>Paramecium tetraurelia</i> | 89 | ---G--T-----G-C-T-C--- | 110 |
| <i>Tetrahymena thermophila</i> | 149 | ---G--T-----G-C-CA--- | 170 |
| <i>Blepharisma japonicum</i> | 89 | ---G-CA-----GCC-TC--- | 110 |
| <i>Mus musculus</i> | 133 | ---G-G-CT-----TA----- | 154 |
| <i>Rattus norvegicus</i> | 89 | ---G-CT-----TAC-G---- | 110 |
| <i>Homo sapiens</i> | 89 | ---G-CT-----TAC-G---- | 110 |
| Séquence consensus Sonde 5S | 1 | GACCGCTTGGGAAGTCCCAGTG | 22 |

Figure 20 : Stratégie pour la recherche d'un gène hautement répété chez *Toxoplasma gondii*



Le profil des produits PCR obtenus montrait deux bandes majoritaires de 180 et 150 pb (figure 21, piste 2). Il restait à vérifier l'identité de ces produits après hybridation avec la sonde oligonucléotidique consensus 5S.

Les expériences qui visaient à cloner l'espace séparant deux unités de répétition du gène ARNr 5S ont été interrompues après parution des travaux de Guay (Guay *et al.*, 1992) dans lesquels l'organisation des gènes ARNr de *Toxoplasma gondii* était décrite. Cette organisation ne correspondait pas à l'organisation la plus fréquemment rencontrée chez les organismes eucaryotes et à partir de laquelle nous avons fondé notre stratégie de clonage. En réalité, elle correspondait à une organisation de type procaryote. Chaque unité de répétition possède un gène ARNr 5S encadré par les gènes ARNr 26 et 18S. Deux gènes ARNr 5S successifs sont donc séparés par 6,8 kpb chez *Toxoplasma gondii*.

Ces résultats (figure 22) montraient que la détermination de la séquence consensus de nos deux amorces était correcte (15% de divergence pour l'amorce 5S G et 18% pour l'amorce 5S D). Par contre, les conditions d'amplification ne nous permettaient pas d'obtenir des fragments PCR supérieur à 1000 pb et de ce fait, de cloner un fragment cible de 6,8 kpb.

3) Gène B1 et augmentation du nombre de cibles d'amplification

Le gène B1 correspond à une séquence d'ADN longue de 2200 pb et répétée 35 fois dans un génome haploïde de *Toxoplasma gondii*. Actuellement, sa fonction est inconnue mais son nombre de répétition est exploité pour augmenter la sensibilité de détection d'un diagnostic de la toxoplasmose par méthode PCR (Burg *et al.*, 1989). Le couple d'amorces (B1-1 et B1-4) décrit et utilisé par les auteurs permet d'amplifier un fragment de 194 pb dont la spécificité est vérifiée par hybridation à l'aide d'une sonde appropriée (figure 23).

Notre stratégie a consisté à rechercher un couple d'amorces différent de celui décrit par les auteurs (figure 23 A) mais appartenant aussi à la séquence du gène B1 et ayant les mêmes caractéristiques physicochimiques en terme de longueur et de pourcentage en GC (figure 23 B). Il devait permettre d'amplifier également un fragment de 194 pb à partir d'une séquence située à environ 1 kb de distance. Ainsi, après amplification avec un mélange réactionnel constitué des deux couples d'amorce (figure 23 C), les deux produits PCR migreront au même niveau sur un gel permettant ainsi, en théorie, de doubler l'intensité du signal en BET. En effet, à partir de ce gène

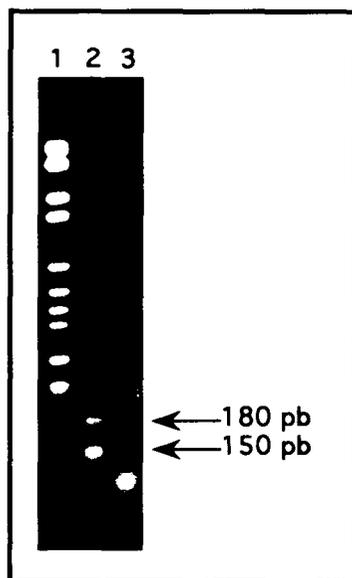


Figure 21 : Amplification d'ADN génomique à partir du couple d'amorces 5S G et 5S D

Chaque réaction d'amplification a été réalisée sur 1 μ g d'ADN génomique comme décrit dans le matériel et méthodes à savoir pour chacun des 35 cycles, 1 mn à 94°C de dénaturation, 30 s à 45°C d'appariement et 1 mn à 72°C d'élongation. 1/10 du produit réactionnel est séparé sur un gel d'agarose 2%. Les bandes 180 et 150 pb correspondent aux produits obtenus après reverse PCR.

piste 1 : Poids moléculaire III (Boehringer mannheim)

piste 2 : *Toxoplasma gondii* (RH)

piste 3 : Témoin négatif (absence de matrice)

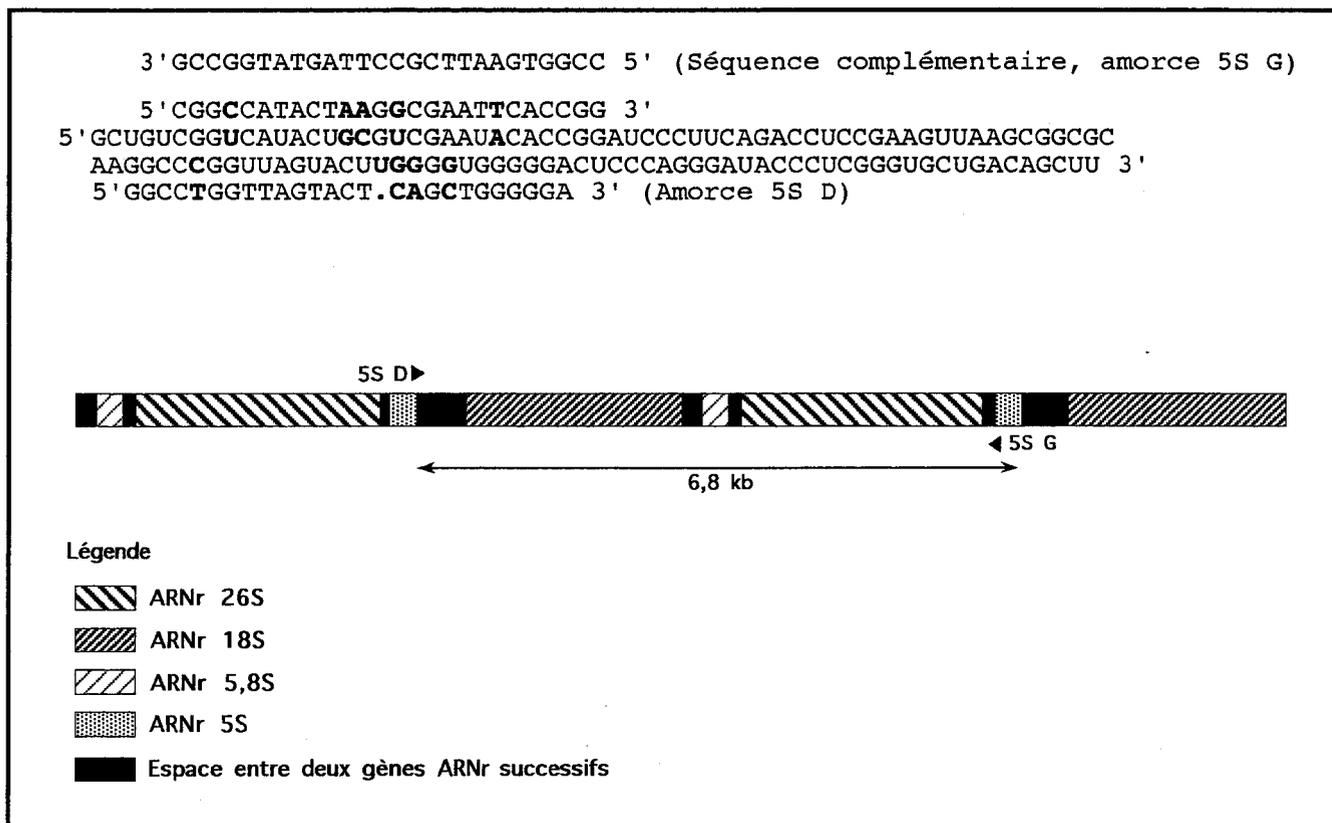


Figure 22 : Positionnement des amorces consensus par rapport à la séquence publiée et à l'organisation des gènes ARNr

Les lettres majuscules en caractère gras correspondent aux bases qui diffèrent entre les amorces et la séquence du gène ARNr 5S. Les amorces 5S G et 5S D utilisées sont indiquées entre parenthèses. La base manquante au niveau de l'amorce 5S D est représentée par un point.

Figure 23 :**A) Position des amorces par rapport à la séquence du gène B1**

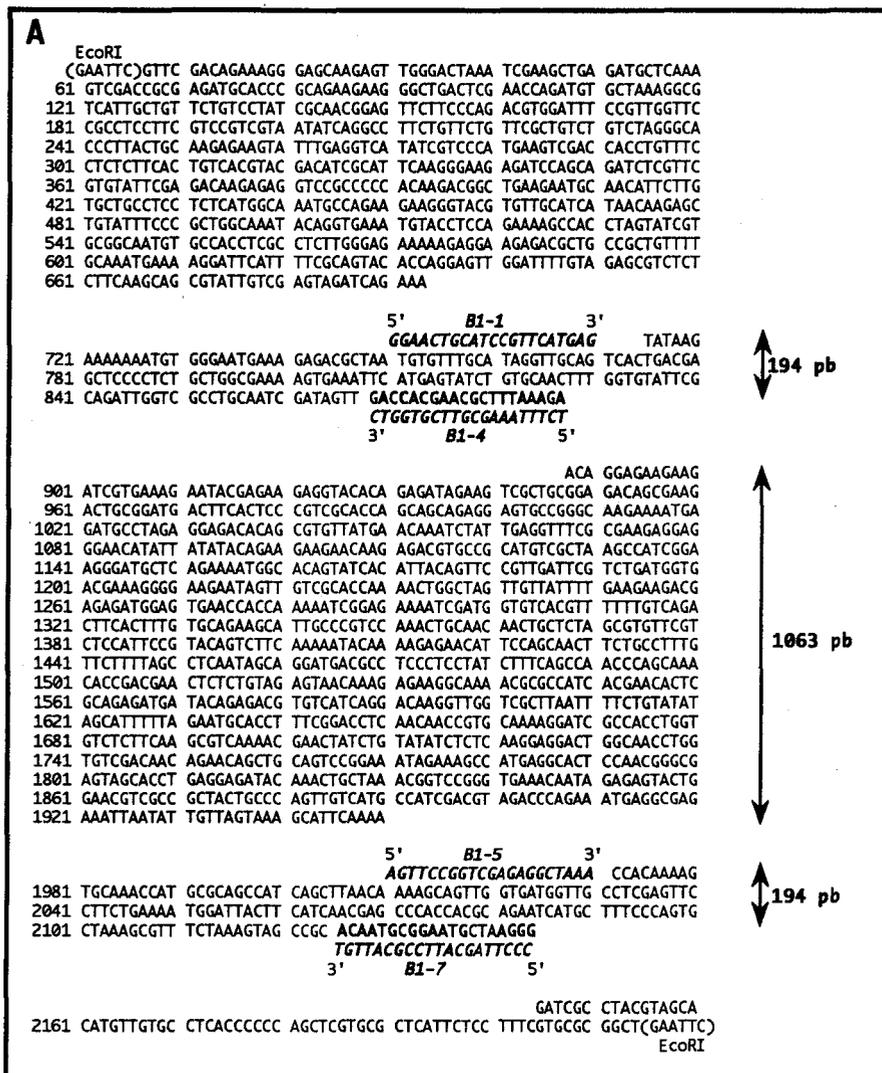
La séquence des quatre amorces B1-1, B1-4, B1-5 et B1-7 est représentée en caractère italique. La séquence des amorces B1-4 et B1-7 correspond à la séquence complémentaire.

B) Tableau des caractéristiques physiques de chacune des amorces

"nb" correspond au nombre de bases, "%GC" représente la richesse de la molécule en bases G et C ($\%GC = (G+C/A+T+C+G) \times 100$) et "Tm" signifie la température de fusion. Le Tm théorique est égale à : $4x(G+C) + 2x(A+T)$.

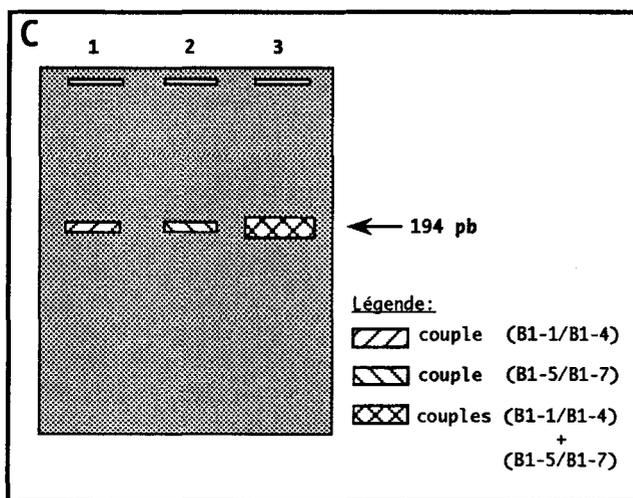
C) Produits PCR théoriques attendus

Ce document correspond à l'image attendue de l'intensité des bandes après coloration au BET des produits d'amplification issus d'ADN génomique de *Toxoplasma gondii* pour les différents couples d'amorces et séparés sur un gel d'agarose.



B

| | nb | % GC | T _m |
|------|----|------|----------------|
| B1-1 | 21 | 52,4 | 64 |
| B1-4 | 20 | 45,0 | 58 |
| B1-5 | 21 | 52,4 | 64 |
| B1-7 | 20 | 50,0 | 60 |



répété 35 fois l'utilisation de deux couples d'amorces distincts pouvait multiplier par deux le nombre de séquences cibles. En somme, cela équivalait à un gène artificiellement répété 70 fois. Les séquences des deux produits PCR étaient séparées par 1063 pb. Ainsi, pour des temps d'élongation court, les produits d'amplification issus de la combinaison (B1-1/B1-7) ne seraient pas générés et de ce fait n'interféreraient pas sur l'efficacité d'amplification des deux produits PCR attendus. Les résultats expérimentaux sont illustrés sur la figure 24.

Pour des conditions d'amplification identiques et pour une même quantité de matrice, le couple d'amorces B1-5/B1-7 (figure 24, piste 2) a permis d'obtenir une production de produits d'amplification supérieure à celle obtenue avec le couple d'amorces B1-1/B1-4 (figure 24, piste 1). Par contre, l'association des deux couples d'amorces (figure 24, piste 3) ne s'accompagnait pas d'une augmentation doublée des produits d'amplification mais au contraire a donné un produit d'amplification légèrement moins intense à celui obtenu avec le couple B1-5/B1-7. Cette inhibition peut être liée à la distance séparant les deux cibles d'ADN et peut s'expliquer par un encombrement stérique lorsque deux molécules d'enzyme (Taq polymérase) agissaient en même temps sur la même matrice initiatrice.

B) Mise au point d'un diagnostic de la toxoplasmose par amplification génique associée à un système de révélation par chimioluminescence

La médecine et la biologie se sont enrichies ces dernières années des techniques moléculaires. La parasitologie tire bénéfice de cet apport pour essayer de pallier aux difficultés de la mise en évidence de certains parasites. L'apport de la "PCR" au diagnostic de la toxoplasmose est un immense progrès. En effet et pour ne citer qu'un exemple, chez les sujets immunodéprimés le diagnostic par sérologie peut s'avérer difficile à réaliser. Par contre, l'amplification génique permet une détection très sensible et spécifique de l'ADN cible.

Nous avons décidé de contribuer au diagnostic de la toxoplasmose congénitale par la détection directe du parasite dans les liquides amniotiques et cela au moyen de la PCR. Cette technique de détection a l'avantage d'être plus fiable et beaucoup plus rapide que les examens classiques.

Pour pallier aux risques de la radioactivité, nous avons sélectionné un système de révélation des produits d'amplification par chimioluminescence. La détection par

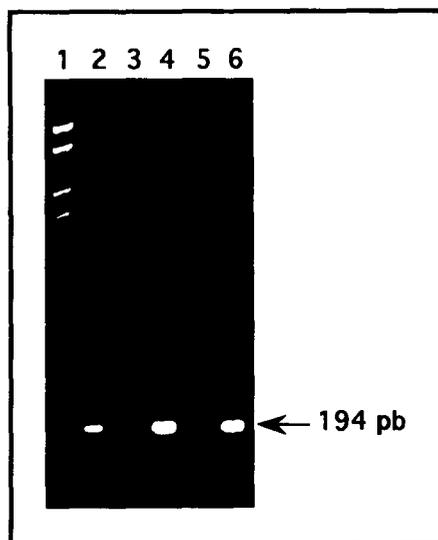


Figure 24 : Données expérimentales

L'amplification de 1 μ g d'ADN génomique de *Toxoplasma gondii* à partir de différents couples d'amorces est réalisée comme décrit dans le matériel et méthodes. Chacun des 55 cycles correspond à 1 mn à 94°C de dénaturation, à 30 s à 45°C d'appariement et à 1 mn à 72°C d'élongation. 1/10 du produit réactionnel est séparé sur un gel d'agarose 2% en TBE 1x sous un ampérage constant de 35 mA. Ce même résultat a été obtenu 3 fois à partir de PCR indépendantes et à partir de lots différents d'ADN génomique.

piste 1 : Poids moléculaire VI (Boehringer mannheim)

piste 2 : couple (B1-1/B1-4)

piste 3 : Témoin eau / couple (B1-1/B1-4)

piste 4 : Couple (B1-5/B1-7)

piste 5 : Témoin eau / couple (B1-5/B1-7)

piste 6 : Couples (B1-1/B1-4) et (B1-5/B1-7)

chimiluminescence trouve son intérêt en laboratoire d'analyse dépourvu de structures appropriées aux managements de la radioactivité.

Les premières études de détection du parasite par PCR réalisées à partir du gène B1 (Burg *et al* , 1989) permettaient d'obtenir un seuil de détection équivalent à 10 parasites. Pour se rapprocher le plus possible des conditions de prélèvement biologique (liquide amniotique), les parasites avaient été au préalable dilués dans un excès de 10^5 cellules humaines avant extraction de l'ADN total. L'échantillon correspondant à 1 parasite donnait un signal négatif.

Notre objectif prioritaire a consisté, dans ces conditions, à obtenir un outil de diagnostic spécifique de l'infection parasitaire et caractérisé par une sensibilité de détection de 1 parasite. Ce diagnostic devait permettre une détection de l'ADN parasitaire avec un taux de réussite de 100% pour tous les échantillons testés. Il devait, de préférence, être construit à partir d'une séquence d'ADN cible répétée et identifiée par notre laboratoire. L'utilisation du couple d'amorces B1-5 et B1-7 donnait des taux d'amplification supérieurs à ceux décrits par l'équipe de Burg. Nous avons donc porté, en partie, nos efforts sur l'utilisation de ce couple pour la mise au point d'un test diagnostique.

1) Mise au point technique

Pour mettre en place le diagnostic de la toxoplasmose par amplification génique et tenir compte des résultats d'amplification obtenus avec le gène B1, il nous fallait, dans un premier temps, vérifier l'identité du produit d'amplification obtenu avec le couple d'amorces B1-5 et B1-7 en utilisant une sonde spécifique (figure 25 B). Nous devons également vérifier l'absence de produits aspécifiques vis-à-vis d'espèces différentes (figure 25).

L'utilisation du couple d'amorces B1-5 et B1-7 ne produisait pas de signal d'amplification avec l'ADN génomique des espèces suivantes : homme, souris, rat, *Leishmania chagasi*, *Trypanosoma cruzi*, *Schistosoma mansoni*, *Bordetella pertussis* et *Plasmodium falciparum* (figure 25 A, pistes 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, et 11). L'ADN de *Toxoplasma gondii*, par contre, donnait une bande de 194 pb. L'hybridation avec la sonde B1-6 confirmait l'absence de produits aspécifiques (figure 25 B, pistes 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 et 11) et la spécificité du fragment de 194 pb (figure 25 B, piste 2). Nous pouvions donc considérer, dans ces conditions expérimentales, que ce couple d'amorces était spécifique vis à vis de l'espèce *Toxoplasma gondii*.

A)

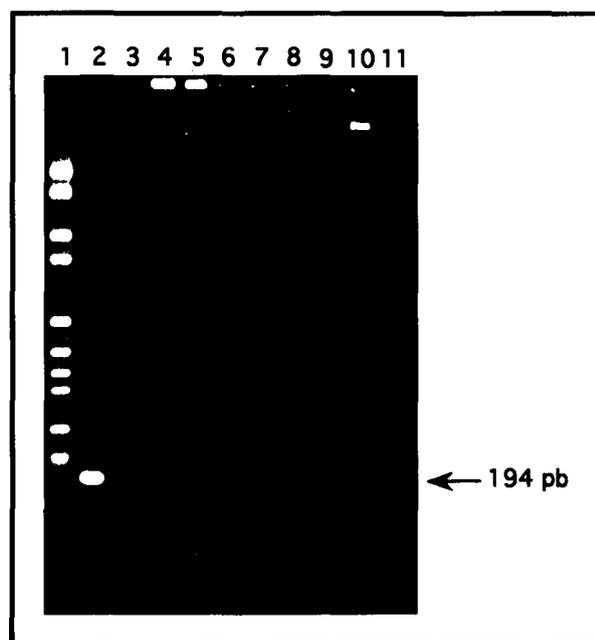


Figure 25 A : Amplification d'ADN génomique de différentes espèces à partir du couple d'amorces B1-5 et B1-7

Les produits réactionnels obtenus après amplification de 1 µg d'ADN génomique de tachyzoïtes (souche RH) purifié sur double gradient de CsCl ou de 1 µg d'ADN génomique d'espèces différentes sont séparés sur un gel d'agarose 2% en TBE 1x sous ampérage constant de 35 mA. La bande de 194 pb correspond au produit PCR attendu pour le couple d'amorces B1-5 et B1-7. Les conditions d'amplification sont celles décrites dans le matériel et méthodes, à savoir pour chacun des 45 cycles une dénaturation de 45 s à 94°C, un appariement de 30 s à 55°C et une élongation de 1 mn à 72°C.

piste 1 : Poids moléculaire VI (Boehringer mannheim)

piste 2 : *Toxoplasma gondii*

piste 4 : ADN génomique humain

piste 6 : ADN génomique de rat

piste 8 : *Trypanosoma cruzi*

piste 10 : *Bordetella pertussis* (0,5 µg)

piste 3 : témoin négatif eau

piste 5 : ADN génomique de souris

piste 7 : *Leishmania chagasi*

piste 9 : *Schistosoma mansoni*

piste 11 : *Plasmodium falciparum*

B)

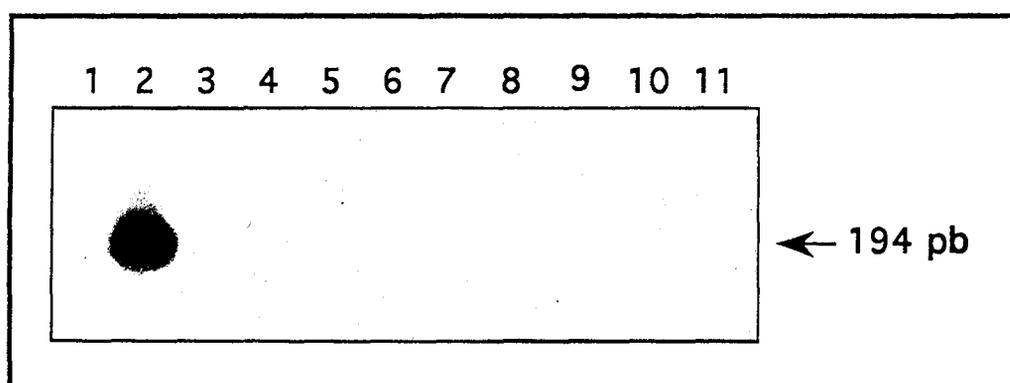


Figure 25 B : Hybridation spécifique des produits PCR résultants

L'hybridation est effectuée une nuit à 42°C en présence d'une sonde oligonucléotide spécifique (B1-6). La membrane est lavée 2x 30 mn à 55°C en 6x SSC et 0,1% SDS puis rincée en 0,1% SDS à température ambiante. L'autoradiographie est obtenue après 3 h d'exposition à -80°C.

Ainsi, à partir du couple d'amorces B1-5 et B1-7, nous avons déterminé les conditions expérimentales qui permettaient l'obtention d'un produit "PCR" spécifique de l'espèce *Toxoplasma gondii*. Dans le but de raccourcir les délais de manipulation liés aux étapes d'hybridation avec une sonde interne spécifique mais également pour éviter l'emploi de produits radioactifs (^{32}P), nous avons favorisé un système de détection directe des produits d'amplification. Ce système reposait sur la reconnaissance des molécules de biotine insérées au niveau des amorces B1-5,4b et B1-7,4b (figure 26) et permettait alors la révélation des produits "PCR" en chimioluminescence.

Pour vérifier si la présence de biotine au niveau des extrémités des deux amorces utilisées ne modifiait pas la spécificité des produits PCR vis-à-vis de l'espèce *Toxoplasma gondii*, nous avons secondairement hybridé les produits PCR révélés en chimioluminescence avec une sonde spécifique (B1-6) marquée au ^{32}P (figure 27 B).

Les débris cellulaires présents dans les préparations d'ADN génomique sont en partie responsables d'inhibition de l'activité enzymatique de la Taq polymérase. Ils provoquent alors une baisse significative du rendement d'amplification. C'est pourquoi et afin de ne pas surestimer le seuil de détection à partir d'une gamme constituée uniquement d'ADN génomique de toxoplasme, nous avons choisi d'utiliser une gamme constituée de toxoplasmes mélangés à un excès de cellules humaines. Ainsi, pour chaque point de la gamme, la quantité de molécules inhibitrices de l'activité reste constante et non diluée.

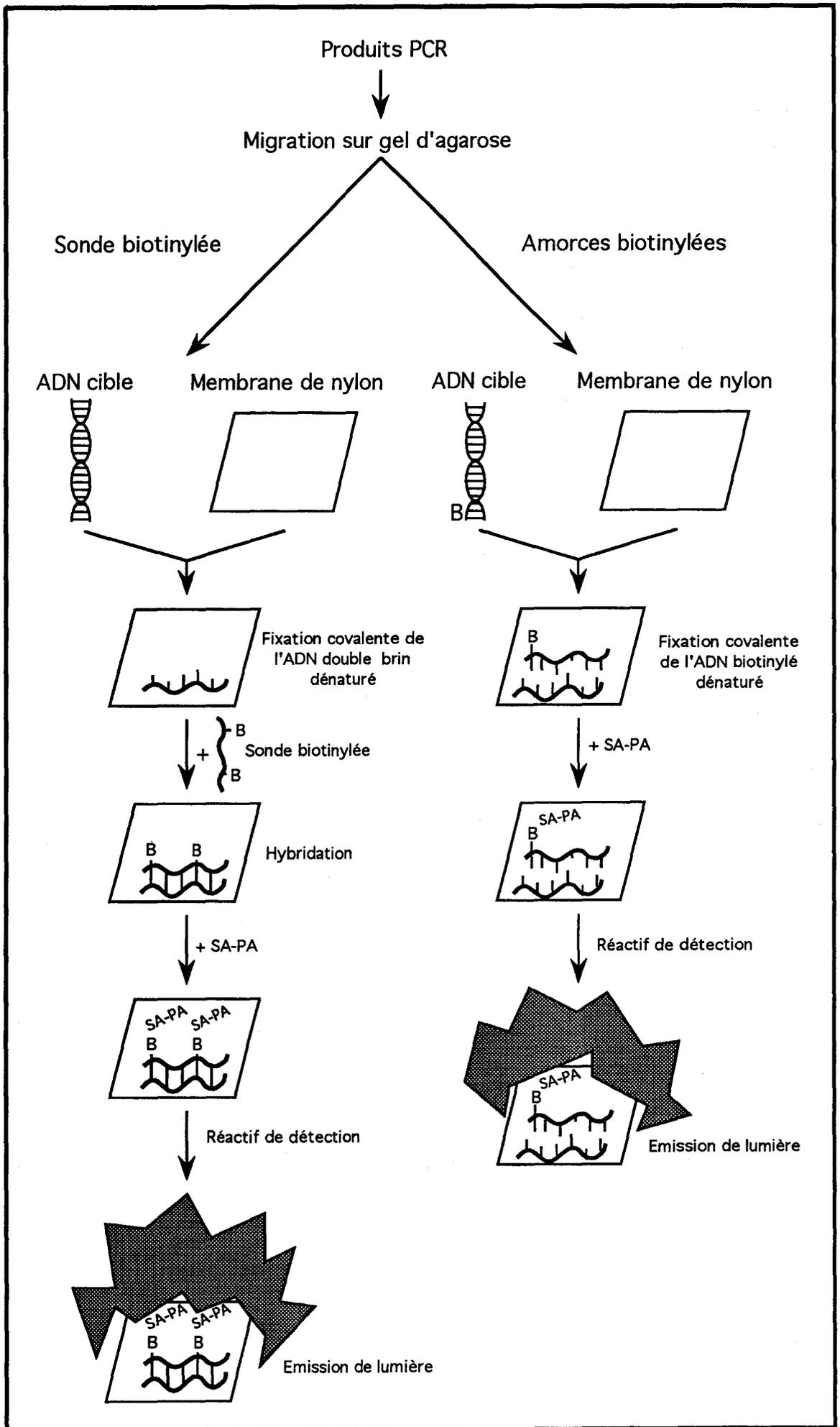
Dans ces conditions et pour savoir si l'objectif de détection d'un seul parasite dans un échantillon biologique donné pouvait être atteint avec un test non radioactif, nous avons réalisé une gamme comprise entre 1 et 10 parasites (figure 27 A). Chaque parasite était prélevé, à partir d'une solution-mère concentrée en parasites, à l'aide d'un micromanipulateur. Ensuite, ils étaient déposés au fond d'un tube eppendorf avant d'être mélangés à un excès de cellules humaines. L'extraction de ce mélange d'ADN génomique était alors effectuée.

Les amplifications d'ADN équivalent à un seul tachyzoïte (figure 27 A, pistes 6, 7 et 8) avaient toutes donné un signal positif. Le seuil de sensibilité de notre test était donc évalué à un tachyzoïte. Le signal positif correspondait à un produit PCR de 220 pb et non plus de 194 pb : les molécules de biotine incorporées aux extrémités 5' de chacune des amorces (B1-5 et B1-7) étaient responsables de cette augmentation de taille.

Les premières gammes testées correspondant à un nombre croissant de tachyzoïtes, étaient inexploitable car 50% des témoins négatifs (0 parasites) étaient

**Figure 26 : Principe du système de révélation par chimioluminescence.
Comparaison avec une hybridation spécifique classique**

Les produits PCR biotinylés sont séparés après amplification sur gel d'agarose, transférés puis fixés covalamment sur membrane de nylon. Les molécules de biotine présentes au niveau des amorces sont reconnues par la streptavidine. Après addition du réactif de détection, la phosphatase alcaline génère un produit dont la dégradation s'accompagne d'émission de lumière. Elle est ensuite matérialisée après exposition de la membrane par autoradiographie. Ce protocole supprime les étapes de préhybridation et d'hybridation ainsi que l'étape de préparation d'une sonde spécifique.



A)

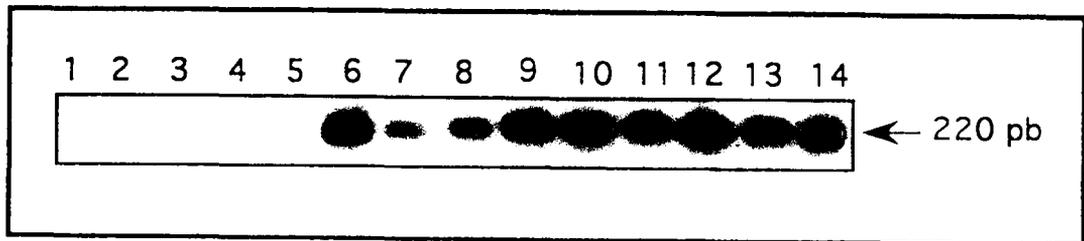


Figure 27 A : Détermination du seuil de détection à partir d'une gamme de tachyzoïtes (amorces B1-5, 4b et B1-7, 4b)

Chaque point de la gamme correspondait à une préparation d'ADN génomique obtenue à partir d'un mélange initialement composé de 10^6 lymphocytes humains et d'un nombre défini de tachyzoïtes (1, 2, 5 et 10). Les tachyzoïtes étaient prélevés individuellement à l'aide d'un micromanipulateur comme décrit dans le matériel et méthodes. Les conditions des 45 cycles d'amplification sont les suivantes : 45 s à 94°C de dénaturation, 30 s à 68°C d'appariement et 1 mn à 72°C d'élongation. La température d'appariement à 68°C était élevée mais elle permet d'éliminer l'apparition de produits aspécifiques favorisée par l'interaction entre les charges positives de la biotine et les charges négatives de l'ADN. 1/10 des produits d'amplification était séparé sur un gel d'agarose NuSieve GTG 3% en "TBE séquence" 1x sous un ampérage constant de 35 mA. Le matériel nucléique était transféré puis fixé sur membrane de nylon. L'autoradiographie était obtenue après 15 mn d'exposition à température ambiante de la membrane préalablement incubée 20 mn à l'obscurité en présence du substrat (chimioluminescence).

Piste 1 : Poids moléculaire VI (Boehringer mannheim)

Piste 2 : Témoin négatif PCR (eau)

Piste 3 : Témoin négatif d'extraction (ADN génomique humain, cellules de la lignée JURKAT)

Piste 4 et 5 : Témoin négatif de prélèvement (10 μl de solution de prélèvement)

Piste 6, 7 et 8 : 1 parasite (parasite isolé, resuspendu dans 10^6 cellules de lignée lymphocytaire)

Piste 9, 10 et 11 : 2 parasites (parasites isolés, resuspendus dans 10^6 cellules de lignée lymphocytaire)

Piste 12 : 5 parasites (parasites isolés, resuspendus dans 10^6 cellules de lignée lymphocytaire)

piste 13 : 5 parasites resuspendus dans la solution PCR après éclatement par la chaleur dans de l'eau

Piste 14 : 10 parasites, même méthodologie que pour la piste 13

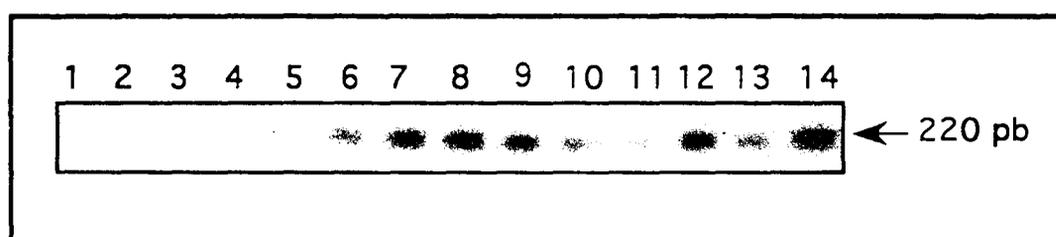
B)

Figure 27 B : Hybridation des produits PCR avec une sonde spécifique (B1-6)

Après chimioluminescence, la même membrane est lavée comme décrit dans le matériel et méthodes puis hybridée une nuit à 42°C avec une sonde oligonucléotide spécifique marquée au ^{32}P (B1-6). La membrane est lavée 2x 30 mn à 55°C en 6x SSC, 0,1% SDS puis rincée deux fois en 0,1% SDS à 25 °C. L'autoradiographie est obtenue après 24 h d'exposition à - 80°C.

contaminés (4 faux positifs sur 8, document non montré). En effet, une bande de 220 pb était visualisée sur le gel d'agarose après coloration au BET. Ces témoins négatifs particuliers correspondaient à 10 μ L de la solution-mère de parasites mais pour lesquels nous avons pris soin, toujours à l'aide du micromanipulateur, de prélever uniquement le liquide dans lequel les parasites baignaient sans prélever les parasites eux-même. Car, il était nécessaire de vérifier que chaque volume de solution prélevé contenait bien le nombre exact de parasites fixé par le manipulateur et d'éliminer ainsi l'hypothèse de leur prélèvement accidentel car non visualisé au niveau de l'écran associé au système du micromanipulateur. Dans ces conditions nous fausserions effectivement par excès le seuil de détection. Cependant, expérimentalement, la fréquence de contamination élevée de ces témoins négatifs ne pouvait pas s'expliquer systématiquement par une erreur de manipulation. L'autre hypothèse, en terme de contamination, était les ruptures membranaires d'un certain nombre de tachyzoïtes qui auraient permis la libération d'ADN génomique dans la solution. Pour confirmer la nature de cette contamination et, par la même occasion y remédier, nous avons mis au point un protocole de digestion de l'ADN libre par un traitement à la DNAase I en milieu isotonique (NaCl à 9 ‰). Notre traitement a permis effectivement de poursuivre l'étude en supprimant définitivement ce problème de contamination des témoins négatifs.

Afin de mimer la présence de cellules humaines au niveau des prélèvements biologiques (liquides amniotiques par exemple), les parasites constituant chaque point de la gamme ont été, au préalable, mélangés à 10^6 cellules humaines.

Les témoins négatifs, correspondant à un mélange de 10^6 cellules humaines et de 10 μ L de solution ayant contenu les parasites et préalablement traitée à la DNAse I (figure 27 A, piste 4 et 5), ne génèrent pas de produits d'amplification. Ils confirmaient que le signal obtenu dans les pistes correspondant à la détection de parasites (figure 27 A, pistes 6 à 14) provenait bien de parasites isolés et intacts et non pas d'une contamination par de l'ADN génomique.

L'identité de la bande de 220 pb (figure 27 B, piste 6 à 14) était vérifiée par hybridation de la sonde B1-6.

2) Recherche de toxoplasmes dans le liquide amniotique

La mise au point de notre test achevée, il restait à vérifier sa fiabilité et sa sensibilité sur des prélèvements biologiques humains. Dans le cas de la toxoplasmose congénitale, deux types de prélèvement avant la naissance des foetus étaient envisageables : le liquide amniotique et le sang du cordon. Cependant, la préparation

d'ADN génomique à partir du sang de cordon ne permettait pas d'obtenir un culot d'ADN complètement dépourvu de résidu d'hème. La présence de cette molécule a un effet inhibiteur pour l'activité enzymatique de la "Taq polymérase" diminuant donc le rendement d'une réaction d'amplification. C'est pourquoi, dans la perspective d'optimiser au maximum la sensibilité de notre test, nous avons choisi de poursuivre notre étude à partir des liquides amniotiques.

En France, le nombre de séroconversions serait compris entre 4 et 16 ‰ chez les femmes enceintes non immunisées (Dupouy-Camet *et al.*, 1993). En tenant compte d'un risque global de transmission foetal de 30% (celui-ci variant selon le terme de la grossesse), le nombre de toxoplasmoses congénitales serait compris entre 700 et 3000 par an soit 1 à 3 ‰ des naissances.

Pour répondre au besoin d'un diagnostic précoce de toxoplasmosse congénitale humaine, nous avons mis au point un outil diagnostique performant. Afin d'en vérifier son efficacité et avant application à des prélèvements humains, nous avons opté pour une analyse de prélèvements animaux dans un modèle de toxoplasmosse congénitale du rat.

Plusieurs modèles expérimentaux de toxoplasmosse avaient été développés. Les travaux du laboratoire concernant la mise en place d'un modèle de toxoplasmosse congénitale se sont concentrés sur le modèle expérimental du rat plutôt que celui de la souris. En effet, le rat semblait un bon modèle pour mimer une infection humaine (Zenner *et al.*, 1999) car c'est un animal naturellement résistant à la toxoplasmosse aigüe contrairement à la souris.

Dans ce modèle développé au laboratoire (utilisant le rat Fisher et 3 souches de toxoplasme) (Zenner *et al.*, 1993), le taux de transmission foetale lors d'une infection entre le 8^{ème} et le 12^{ème} jour de gestation était de 58,2% pour la souche RH, 35,2% pour la souche 76K et de 62,8% pour la souche Prugniaud. Il était donc préférable de choisir la souche qui a le taux de passage maximum pour favoriser l'obtention de foetus contaminés. Nous avons donc sélectionné la souche Prugniaud.

Nous disposions également au laboratoire d'un test ELISA (Zenner *et al.*, 1993) permettant de tester la contamination foetale. Chaque foetus récupéré séparément était broyé puis l'homogénat résultant était subinoculé à des souris. L'analyse des sérums par une recherche des IgM totaux permettait alors de vérifier si le subinoculum était responsable d'une réponse immunitaire à médiation humorale. Ainsi, la présence d'anticorps sériques était à associer à une infection de l'animal par des toxoplasmes

vivants. La PCR permettait, quant à elle, de détecter la présence de toxoplasmes aussi bien morts que vivants.

Pour augmenter théoriquement le taux d'infection du fœtus par le parasite, nous avons choisi de réaliser notre étude sur une lignée de rates immunodéficientes (rates "Nude") car nous avons supposé que le parasite, dans ces conditions, ne serait pas éliminé par le système immunitaire spécifique de la mère.

25 liquides amniotiques de rates gestantes individualisés ont été testés par PCR (figure 28 A) puis les produits d'amplification révélés ont été vérifiés par hybridation avec une sonde spécifique (figure 28 B). Dans la série étudiée, 88% (22/25) des fœtus étaient issus de rates "Nude". Le prélèvement et la préparation de l'ADN issu des liquides amniotiques ont été décrits dans le matériel et méthodes. Les résultats d'amplification et de sérologie ont été reportés dans le tableau 1.

La bande de 220 pb correspondant au produit PCR attendu (figure 28 A) était reconnue par la sonde B1-6 (figure 28 B), confirmant la spécificité du signal révélé par chimioluminescence.

La totalité des fœtus récupérés n'ont pu être analysés par PCR car la quantité de liquide amniotique disponible au niveau de la cavité amniotique été, dans la moitié des cas (25 sur 50), insuffisante pour pouvoir être techniquement prélevée. En effet, les prélèvements ont été effectués à un stade tardif de la gestation, stade durant lequel le fœtus occupe la quasi totalité de la cavité amniotique au détriment du liquide amniotique.

Sur les 25 liquides amniotiques testés, 3 se sont révélés être positifs en PCR (tableau 1, fœtus : 2G, 5C et 5E). Dans ces trois cas, la sérologie était négative et indiquait donc la non-contamination des fœtus. Dans le cas des rates Nude, nous nous attendions à un taux élevé de fœtus contaminés pourtant les résultats expérimentaux montrent un taux relativement faible de fœtus infectés (27%). Pour les fœtus infectés (2K, 5G et 5 H), la PCR n'a pu être réalisée.

Dans cette étude, nous n'avons pas observé de corrélation directe entre "PCR positive" et "contamination du fœtus". Par PCR, nous avons analysé le liquide qui entourait le fœtus alors que le test ELISA tient compte de la totalité du fœtus (4 mL d'homogénat correspondant à un fœtus sont subinoculés à 8 souris). Il existe donc une différence importante dans les volumes analysés, différence qui pourrait expliquer les résultats obtenus. Les fœtus étaient sacrifiés 2 à 3 jours avant la naissance, donc en phase terminale de gestation. Une étude cinétique à différents temps de gestation après infection pourrait être intéressante.

A)

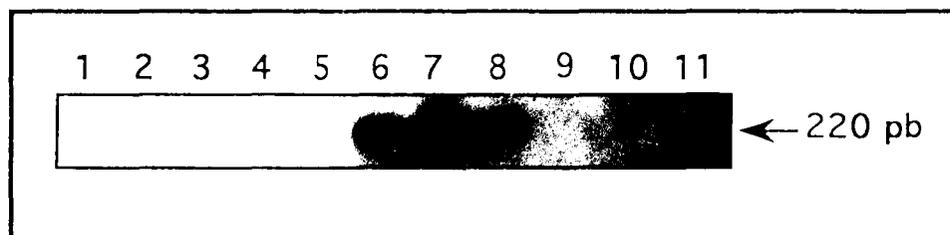


Figure 28 A : Détection de parasites dans des liquides amniotiques issus de rates gestantes

L'amplification est réalisée en présence du couple d'amorces B1-5, 4b et B1-7, 4b. Chacun des 45 cycles est constitué d'une étape de dénaturation, d'appariement et d'élongation respectivement de 45 s à 94°C, 30 s à 68°C et 1 mn à 72°C. 1/10 du produit d'amplification est séparé sur gel d'agarose (3% NuSieve GTG) en "TBE séquence" 1x sous ampérage constant de 35 mA. Après transfert et fixation covalente sur membrane de nylon, les produits PCR sont révélés par chimioluminescence. L'autoradiographie est obtenue après 20 mn d'exposition à température ambiante de la membrane préalablement incubée 20 mn à l'obscurité en présence du substrat (chimioluminescence).

Piste 1 : Marqueur de poids moléculaire VI (Boehringer mannheim)

Piste 2 : 1 µg d'ADN de tachyzoites (RH), Produits PCR dilués au 1/100 avant dépôt sur gel

Piste 3 à 4 : Liquides amniotiques issus de rates Fisher

Piste 5 à 11 : Liquides amniotiques issus de rates Nude

B)

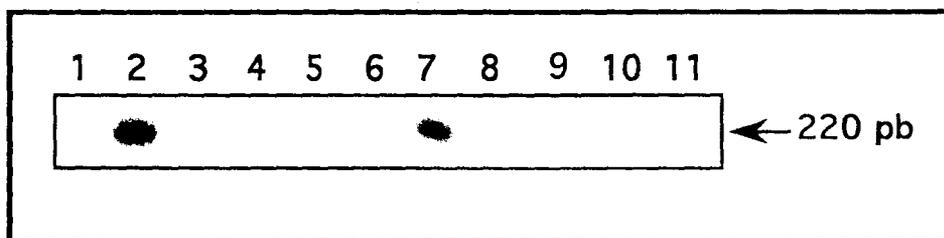


Figure 28 B : Hybridation spécifique des produits d'amplification

Après chimioluminescence, la même membrane est lavée 1 h à 70°C en 0,1% SDS puis hybridée une nuit à 42°C avec une sonde oligonucléotide spécifique marquée au ^{32}P (B1-6). La membrane est lavée 2x 30 mn à 55°C en 6x SSC, 0,1% SDS puis rincée en 0,1% SDS à température ambiante. L'autoradiographie est obtenue après 24 h d'exposition à -80°C.

Tableau 1 : Résultats PCR et sérologiques des 25 liquides amniotiques testés

Les liquides amniotiques sont récupérés 20 jours après la fécondation des rates Fischer ou Nude infectées 12 jours auparavant par voie orale par 12000 kystes (souche Prugniaud). Cinq rates gestantes ont été étudiées. Les prélèvements de liquide amniotique n'ont pas pu être réalisés pour tous les foetus. Pour une rate donnée, chaque foetus individualisé est identifié par une lettre majuscule. La préparation des échantillons et les conditions d'amplification sont décrites dans le matériel et méthodes. Brièvement, chacun des 45 cycles d'amplification est constitué d'une étape de dénaturation de 45 s à 94°C, d'une étape d'appariement de 30 s à 68°C et d'une étape d'élongation de 1 mn à 72°C. Parallèlement, l'infection des foetus de rat par le parasite était analysée par un test ELISA (Zenner *et al.*, 1993). Ainsi, six semaines après subinoculation par du tissu broyé de foetus de rat, les Ig totaux sériques de souris OF1 étaient mesurées. Le nombre total de foetus correspond au nombre de foetus par portée.

| | Série | Foetus | PCR Liquide Amniotique | Sérologie Souris OF1 | Nombre total de foetus |
|----------------|-------|--------|------------------------------|-------------------------|---------------------------|
| Rate Fisher | 1 | A | n.d. | n.d. | 8 |
| | | B | n.d. | n.d. | |
| | | C | - | n.d. | |
| | | D | n.d. | n.d. | |
| | | E | - | n.d. | |
| | | F | - | n.d. | |
| | | G | n.d. | n.d. | |
| | | H | n.d. | n.d. | |
| Rate Nude | 2 | A | - | - | 11 |
| | | B | - | - | |
| | | C | - | - | |
| | | D | - | - | |
| | | E | - | - | |
| | | F | - | - | |
| | | G | + | - | |
| | | H | - | - | |
| | | I | - | - | |
| | | J | n.d. | - | |
| | | K | n.d. | + | |
| Rate Nude | 3 | A | - | - | 11 |
| | | B | - | - | |
| | | C | - | n.d. | |
| | | D | - | n.d. | |
| | | E | - | n.d. | |
| | | F | - | n.d. | |
| | | G | n.d. | n.d. | |
| | | H | n.d. | n.d. | |
| | | I | n.d. | n.d. | |
| | | J | n.d. | n.d. | |
| | | K | n.d. | n.d. | |
| Rate Nude | 4 | A | - | - | 10 |
| | | B | - | - | |
| | | C | n.d. | - | |
| | | D | n.d. | - | |
| | | E | n.d. | - | |
| | | F | n.d. | - | |
| | | G | n.d. | - | |
| | | H | n.d. | - | |
| | | I | n.d. | - | |
| | | J | n.d. | - | |
| Rate Nude | 5 | A | - | - | 10 |
| | | B | - | - | |
| | | C | + | - | |
| | | D | - | - | |
| | | E | + | - | |
| | | F | n.d. | - | |
| | | G | n.d. | + | |
| | | H | n.d. | + | |
| | | I | n.d. | - | |
| | | J | n.d. | - | |

II) QUANTIFICATION DE LA CHARGE PARASITAIRE INTRATISSULAIRE

Au cours de la phase aigüe de la toxoplasmose, l'apparition de la réponse immunitaire chez les sujets immunocompétents est à l'origine de l'arrêt de la dissémination du parasite. Favorisée par cette réponse, la transformation des tachyzoïtes en bradyzoïtes amorce la formation de kystes dans certains organes où la défense immune est supposée plus faible (muscles, cerveau, coeur et yeux). Ces kystes persisteront alors pendant toute la vie de l'hôte.

L'infection d'hôtes immunodéprimés est l'une des deux formes les plus graves de la toxoplasmose. Ainsi, chez les patients atteints du SIDA, la réactivation de la maladie à partir de kystes peut aboutir à une encéphalite toxoplasmique très grave, voire mortelle. C'est pourquoi l'élaboration de nouveaux traitements chimiques capables d'enrayer une réactivation des kystes ou capables d'éliminer définitivement les formes parasitaires intracérébrales, apparait comme un atout majeur pour le suivi médical de ces sujets immunodéprimés. Pour vérifier l'efficacité de tels traitements, il est nécessaire de les tester sur un modèle expérimental animal mimant au mieux cette maladie chez l'homme. De plus, leur impact sur la variation de la charge parasitaire cérébrale doit également être contrôlé et cela grâce à un outil de quantification performant et adapté.

Nous avons sélectionné le modèle souris plutôt que le rat parce qu'un cerveau de souris est plus petit en volume. Il nous permet, dans ces conditions, une étude plus aisée sur la totalité du cerveau, et non sur une fraction. Différentes souches de souris étaient disponibles dans notre laboratoire dont les souches OF1, BALB/C et C 57 BI/6. Ces deux dernières ont été utilisées pour la production de kystes cérébraux et ont été ensuite exploitées dans un modèle de quantification d'une charge parasitaire cérébrale grâce à un outil de PCR quantitative sur ADN. De plus, l'atout principal de l'espèce souris (*Mus domesticus domesticus*) est qu'elle est, au même titre que l'homme, un hôte intermédiaire du cycle d'infection du parasite, avec des modalités d'infection et de production de kystes cérébraux superposables.

Il nous fallait également sélectionner une souche de toxoplasmes peu pathogène et kystogène. Deux souches répondaient à ces critères : La souche 76K et la souche Prugniaud.

Pour étudier la variation de la charge parasitaire intracérébrale, c'est à dire le nombre de bradyzoïtes présents au sein des kystes, il était primordial de disposer d'un outil adapté. Or, la seule technique qui existait était celle du comptage manuel du nombre de kystes au microscope photonique. Le nombre de bradyzoïtes était ensuite

approximativement estimé à partir du nombre de kystes. Méthode très lourde en temps car chaque estimation du nombre moyen de kystes par cerveau était réalisée à partir de plusieurs points de mesure (aliquots de 10 μ L). De plus, la reconnaissance des kystes les moins volumineux était souvent difficile.

Dans notre étude, notre objectif était d'exprimer la charge parasitaire cérébrale sous la forme d'une valeur numérique fiable et rapide à obtenir. Nous avons donc choisi de développer un modèle de quantification de la charge parasitaire à partir de la technique PCR. Ce modèle nous permettrait de ramener directement la charge parasitaire à un nombre de bradyzoïtes sans tenir compte du nombre et de la taille des kystes. Le résultat serait le reflet du nombre de génomes qui est égal au nombre de parasites présents dans l'échantillon analysé. Comme illustré dans la figure 29 où la coloration des noyaux des bradyzoïtes facilite la recherche des kystes dans un broyat de cerveau, des kystes de tailles différentes peuvent coexister dans un même cerveau de souris. Le nombre de bradyzoïtes pouvant varier d'un facteur 1000 entre deux kystes, des erreurs peuvent en découler sur la détermination de la charge parasitaire par le seul dénombrement des kystes. Or, nous pouvons très bien concevoir qu'au début d'un traitement seul le nombre de bradyzoïtes diminue sans modifier le nombre de kystes.

Pour entreprendre notre étude, nous devons disposer de deux outils : un modèle de PCR quantitative et un modèle animal permettant d'obtenir des kystes intracérébraux non létaux pour l'animal (emploi d'une souche de parasite faiblement pathogène).

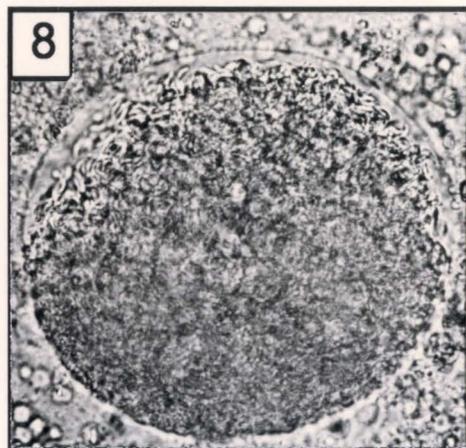
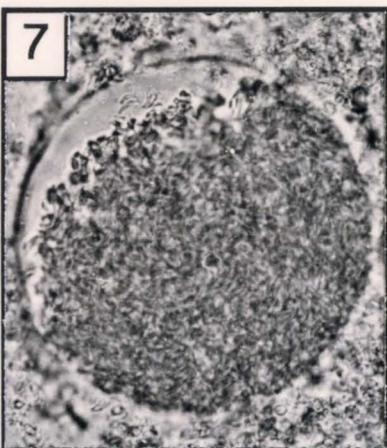
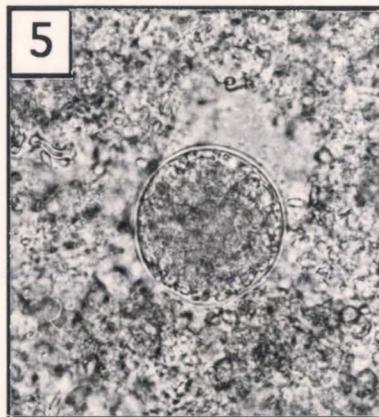
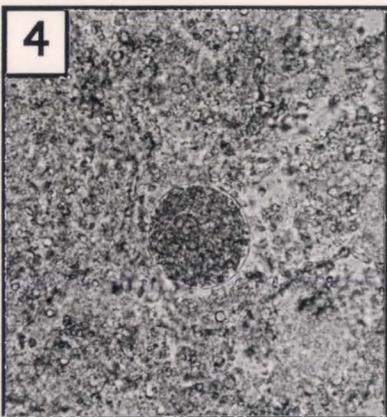
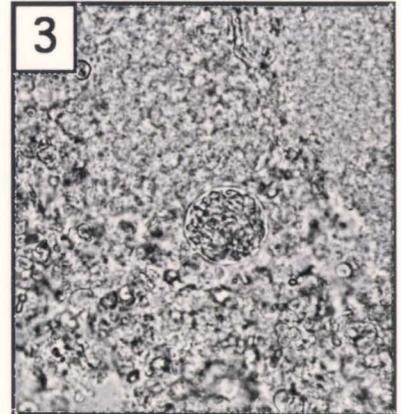
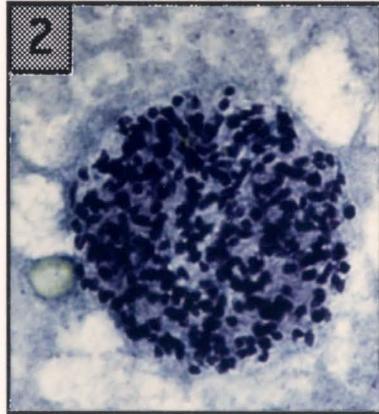
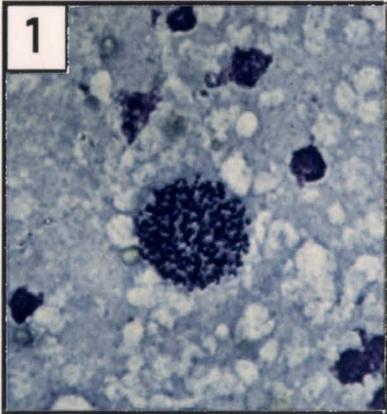
Nous développerons d'abord la mise au point du modèle de PCR quantitative. Nous présenterons ensuite le modèle animal développé expérimentalement pour répondre au mieux aux questions posées (évolution des kystes cérébraux suite à un traitement médical).

La PCR a permis d'accroître à la fois la sensibilité et la spécificité de l'analyse des acides nucléiques. Elle est devenue l'un des outils fondamentaux de la recherche en biologie moléculaire et son usage s'est considérablement étendu à de nombreuses applications. Elle présente toutefois quelques limites, comme par exemple sa difficulté pour l'analyse quantitative. En effet, la quantité de produit obtenu lors d'une PCR n'est pas directement proportionnelle à la quantité de matrice soumise initialement à l'amplification. Ce phénomène résulte des caractéristiques même de la PCR (effet de plateau). Il est cependant possible d'évaluer cette quantité de matrice initiale par la co-amplification d'une séquence standard d'acides nucléiques au cours de la réaction. La molécule étalon permet ainsi de réajuster les différences de rendement d'amplification d'un échantillon à l'autre. En effet, le résultat de l'analyse donne une évaluation de la

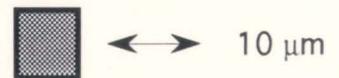
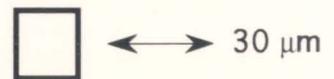
Figure 29 : Photographies de kystes (76 K) issus d'un broyat de cerveau

Les cerveaux issus de souris infectées par voie intrapéritonéale (souche 76 K) sont préparés comme décrit dans le matériel et méthodes. Les kystes n°1 et 2 ont été colorés par une technique dérivée de May-Gründwald-Giemsa. La taille des kystes pour un grossissement donné, a été déduite par comparaison avec la graduation obtenue à partir d'une lame à échelle microscopique (stage micrometter, 100 x 001 = 1 mm, Graticules LTD, Tonbriges Kend England). Echelle : la distance comprise entre les deux extrémités des flèches est équivalente à 30 μm pour les kystes dont la numérotation est contenue dans un carré blanc et à 10 μm uniquement pour le kyste n°2. Les photographies n° 1 et 2 prises à deux grossissements différents, correspondent au même kyste. Les kystes des photographies n° 3, 4, 5, 6, 7 et 8 sont issus d'un même cerveau et correspondent respectivement à un diamètre de 22, 30, 44, 77, 100 et 120 μm . Il existe ainsi une différence d'un facteur de 160, en terme de volume, entre le kyste n°3 et n°7 (même grossissement).

Considérant les diamètres ainsi estimés, le volume des kystes n°3, 4, 5, 6, 7 et 8 peut être évalué respectivement à 44 602, 113 097, 356 818, 912 320, 4 188 790 et 7 238 229 μm^3 . Le volume théorique d'un bradyzoïte (représenté par un cylindre de 7 μm de hauteur et d'un diamètre de 2 μm) est de 88 μm^3 et en admettant que les bradyzoïtes n'occupent que 70% de l'espace disponible dans un kyste, nous obtenons un nombre de bradyzoïtes par kystes égal à 354, 897, 2 838, 7257, 33 320 et 57 576 bradyzoïtes par kyste. En tenant compte de leur proportion relative à leur taille, dans un même cerveau (10%/n°3, 10%/n°4, 60%/n°5, 10%/n°6, 7%/n°7 et 1%/n°8), on peut estimer le nombre moyen de bradyzoïtes par kyste à environ 6 000. Cependant, une proportion parmi les kystes les moins volumineux a certainement échappé au comptage manuel. Il en résulte alors une surestimation du nombre des kystes les plus volumineux se traduisant également par une surestimation du nombre moyen de bradyzoïtes par kystes. Dans ces conditions et par mesure de précaution, nous ramènerons ce nombre moyen à 3000 au lieu de 6000.



Echelle



quantité relative de matrice par rapport au standard. La valeur réelle est alors calculée à partir d'une courbe normalisée. Il est donc possible de quantifier grâce à ce type de PCR un nombre de molécules d'ADN initialement présentes dans un échantillon.

Comme la région d'ADN génomique amplifiée dépend du gène cible choisi, il faut associer à chaque séquence un étalon interne différent. Comme nous disposions de plusieurs séquences spécifiques du génome de *Toxoplasma gondii*, nous avons entrepris de construire non pas plusieurs molécules étalon mais une seule à spécificité multiple. Ainsi, grâce à ce type de molécule dite "molécule standard polyspécifique", plusieurs gènes peuvent servir de candidats à la quantification de la charge parasitaire.

Le profil, en terme d'agencement des différentes régions génomiques de la molécule standard polyspécifique que nous avons choisi d'élaborer, est illustré par la figure 30. Elle renferme, dans sa séquence, les différentes cibles complémentaires aux amorces correspondant à deux gènes répétés connus pour le toxoplasme (B1 et ARNr) et à un gène unique codant pour la protéine SAG1 (P30), antigène majeur de surface des tachyzoïtes. Une telle construction est rendue techniquement possible grâce à une stratégie PCR avec emploi d'amorces aux extrémités 5' flottantes. Ce principe est commenté et illustré par la figure 31.

La séquence de la molécule standard d'ADN devait être la plus proche possible de la séquence cible tout en tenant compte de la contrainte supplémentaire liée au choix du système de révélation (Chimiluminescence, figure 26). Ainsi, après avoir transféré les produits PCR sur membrane de nylon, il était impératif que le produit PCR issu de la molécule standard et celui obtenu à partir du génome du parasite soient de taille suffisamment différente pour être physiquement séparables sur gel d'agarose. Nous nous sommes donc imposés une différence de taille d'environ 100 pb (figure 30) pour obtenir une très bonne résolution de ces deux produits PCR pour un couple d'amorces donné.

La construction de la molécule standard pouvait être rapide dans la mesure où chaque étape PCR, à l'exception de la première, utilisait comme matrice d'ADN le produit d'amplification de l'étape précédente. Les résultats expérimentaux liés à la construction de notre molécule étalon sont illustrés dans la figure 32.

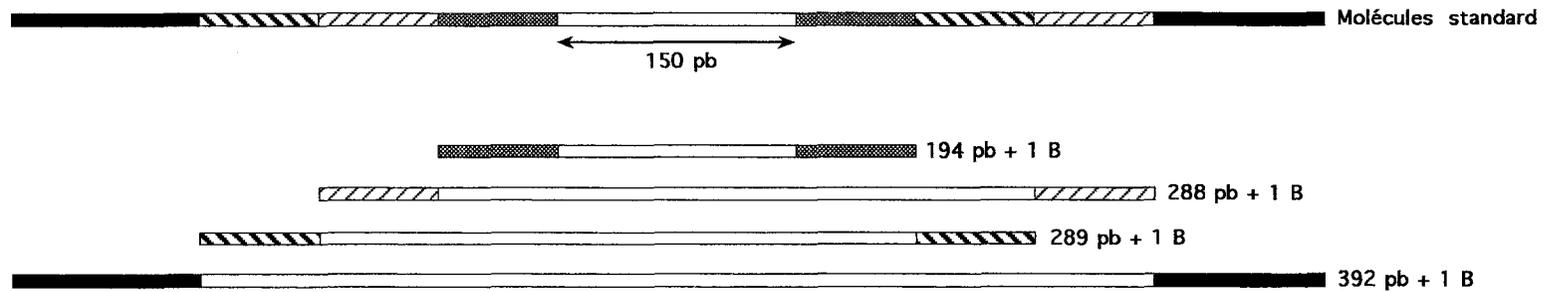
Les deux premières étapes PCR (figure 32 A, piste 2 et 3) génèrent un produit PCR simple correspondant à une seule bande, de taille attendue (201 et 253 pb). Les matrices respectives de ces deux étapes sont le vecteur pBluescript SK (-) et 1/100 du produit réactionnel de la PCR A. La troisième étape de la construction de la molécule standard (figure 32 A, piste 4) est caractérisée par une bande majoritaire de taille

Figure 30 : Représentation de la molécule standard polyspécifique.

Tailles résultantes des produits PCR et différence avec celles issues du génome parasite

En dessous de la molécule standard sont représentés les différents produits PCR obtenus pour chacun des quatre couples d'amorces (représentés par un motif différent). Les gènes B1 α et β correspondent respectivement aux couples d'amorces (B1-1/B1-4) et (B1-5/B1-7). Le tableau indique pour un couple donné la taille du produit PCR obtenu à partir soit de la molécule standard soit de la cible génomique. La différence de taille y est également indiquée. "B" correspond à la molécule de biotine apportée par l'une des deux amorces de chacun des quatre couples représentés. Le motif "blanc" est constitué d'une région d'ADN de 150 pb et issue du vecteur de clonage pBluescript SK (-).

TAILLE DES FRAGMENTS AMPLIFIES

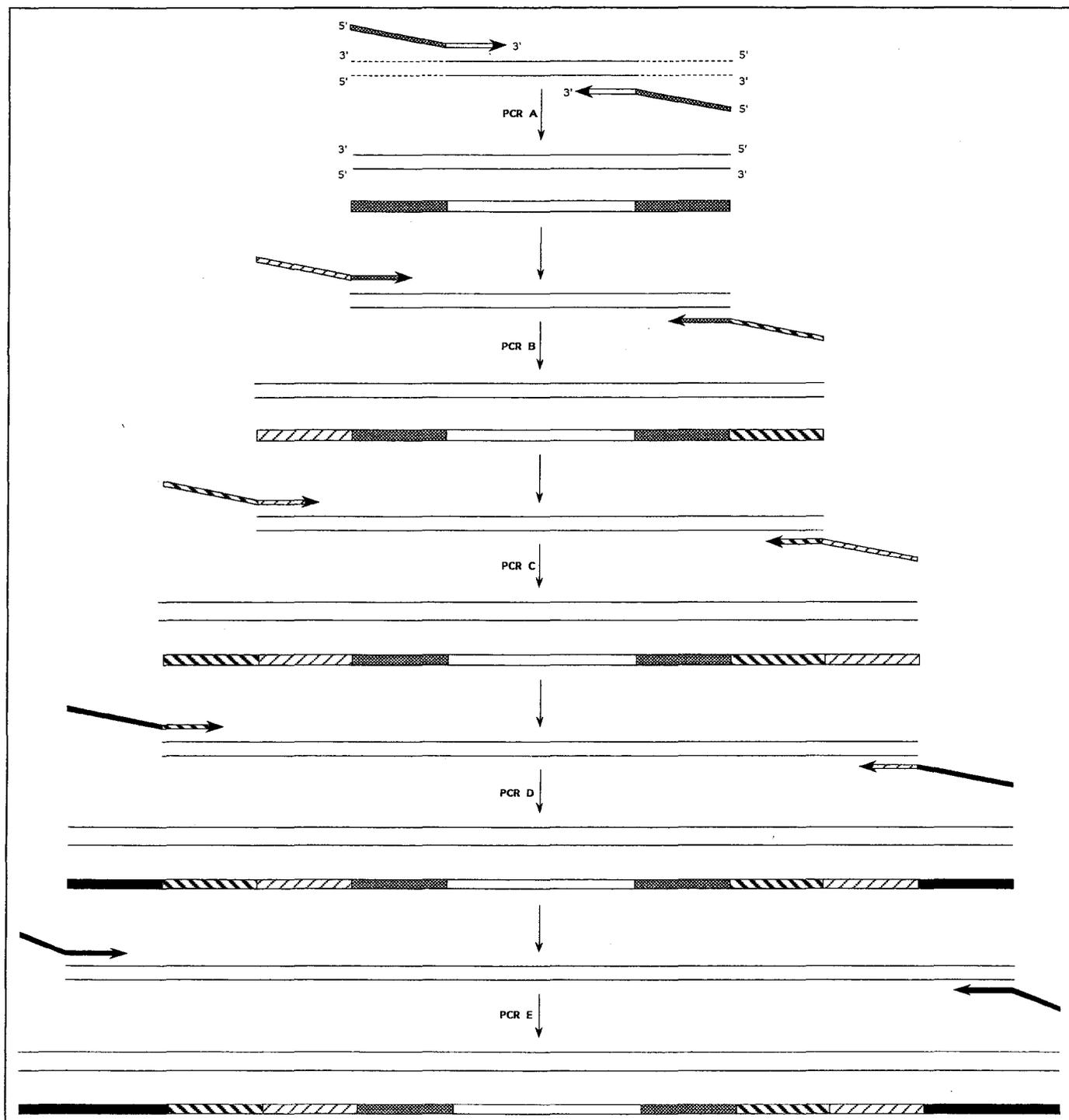


| | | Matrice PCR | | |
|---------|--------------------|-------------------|---------------|---|
| Amorces | | Molécule standard | ADN Génomique | Différence de taille entre les deux fragments PCR |
| | ARNr 18 S | 194 pb + 1 B | 89 pb + 1 B | 105 pb |
| | Gène B 1 α | 288 pb + 1 B | 195 pb + 1 B | 93 pb |
| | Gène B 1 β | 289 pb + 1 B | 195 pb + 1 B | 94 pb |
| | Gène P 30 | 392 pb + 1 B | 283 pb + 1 B | 109 pb |
| | pBluescript SK (-) | | | |

B = Biotine

Figure 31 : Schéma théorique de la construction d'une molécule standard polyspécifique

Lors de la première étape PCR (PCR A), Les deux amorces aux extrémités 5' flottantes reconnaissent par le biais de leur extrémité 3', la molécule cible d'ADN par appariement homologue. A l'issue de cette étape, on obtient une molécule d'ADN chimère constituée par partie des deux amorces du gène ARN 18S et par la molécule cible (séquence pBluescript) comprise entre ces deux amorces. Lors de l'étape PCR B cette molécule chimère devient la cible d'ADN pour le couple d'amorces suivant. A cette étape, les extrémités 3' des amorces reconnaissent par appariement homologue l'équivalent des régions 5' flottantes du couple d'amorces précédent. Cette deuxième molécule chimère résultante, est alors constituée de la première molécule chimère et des régions 5' flottantes des amorces utilisées au cours de la PCR B. Ainsi, grâce à l'enchaînement de ces différentes étapes PCR, on peut obtenir une molécule chimère constituée de la première molécule cible contenant les deux régions 3' homologues du premier couple d'amorces et de la somme des différentes régions 5' flottantes de l'ensemble des couples d'amorces utilisés dans les différentes étapes. A l'issue de l'étape PCR E, les 409 pb du produit PCR correspondant à la molécule standard posséderont les séquences complémentaires des quatre couples d'amorces choisis (ARNr 18S, B1 α , B1 β et P30).



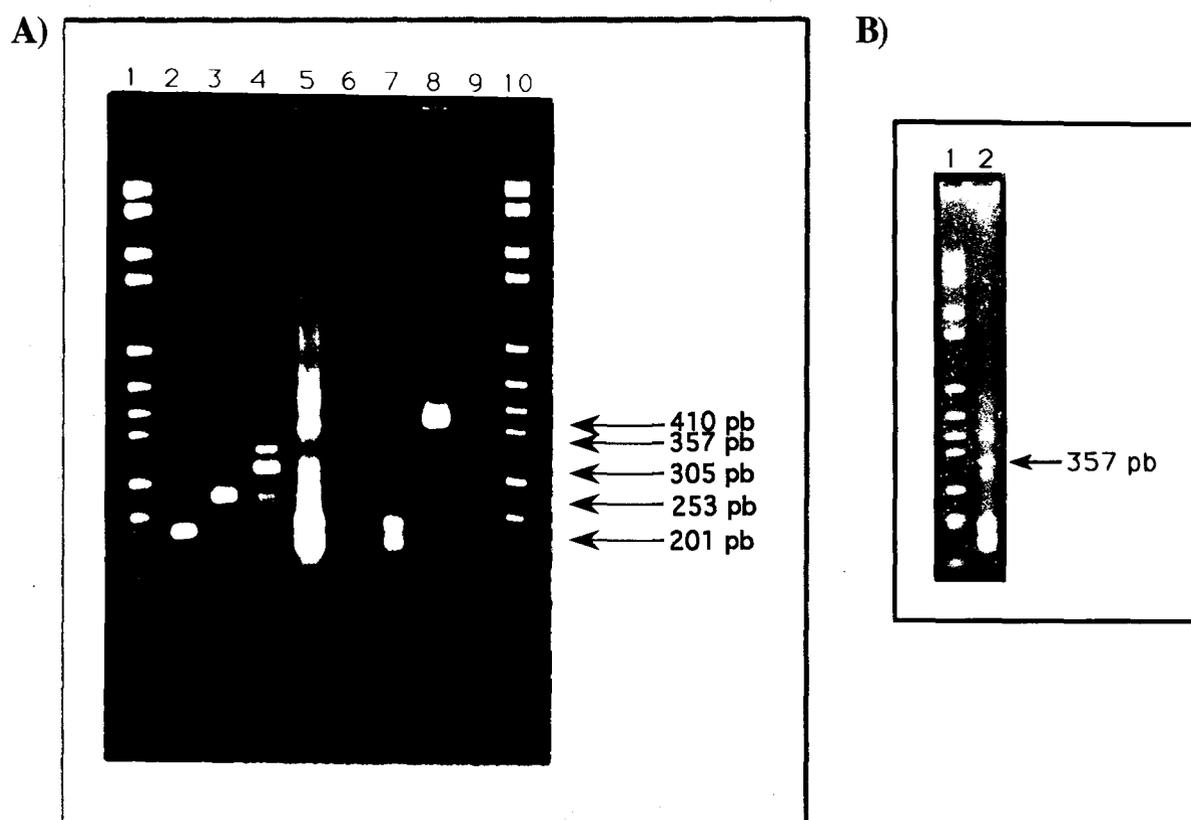


Figure 32 : A) Etapes PCR de la construction de la molécule étalon

1/10 de produit PCR sont séparés sur gel d'agarose 2% en TBE 1x. L'amplification de chacune de ces étapes s'effectue de la manière suivante : 3 mn 15 s à 94°C de prédénaturation, 45 s à 94°C de dénaturation, 30 s d'appariement, 1 mn à 72°C d'élongation et 7 mn à 72°C d'élongation finale. Les conditions de température d'appariement et le nombre de cycle de chacune de ces PCR sont précisés entre parenthèse. Les tailles attendues des fragments d'amplification (201, 253, 305, 357 et 410 pb) correspondant au différentes étapes de la construction de la molécule étalon, sont exprimées en pb. Ces valeurs n'ont aucun rapport avec celles indiquées dans le tableau de la figure 17 (194, 288, 289 et 392 pb).

piste 1 et 10 : Poids moléculaire VI (Boehringer mannheim)

piste 2 : Etape PCR A (50°C et 45 cycles)

piste 3 : Etape PCR B (50°C et 45 cycles).

piste 4 : Etape PCR C (60°C et 35cycles)

piste 5 : Etape PCR D (60°C et 35 cycles)

piste 6 : Purification de la bande de 305 pb

piste 7 : Etape PCR D (35°C et 40 cycles).

piste 8 : Etape PCR E (40°C et 45cycles)

piste 9 : Témoin négatif eau / étape PCR A

B) Etape PCR D pour une matrice purifiée deux fois sur gel

piste 1 : Poids moléculaire VI (Boehringer mannheim)

piste 2 : Etape PCR D (35°C et 40 cycles)

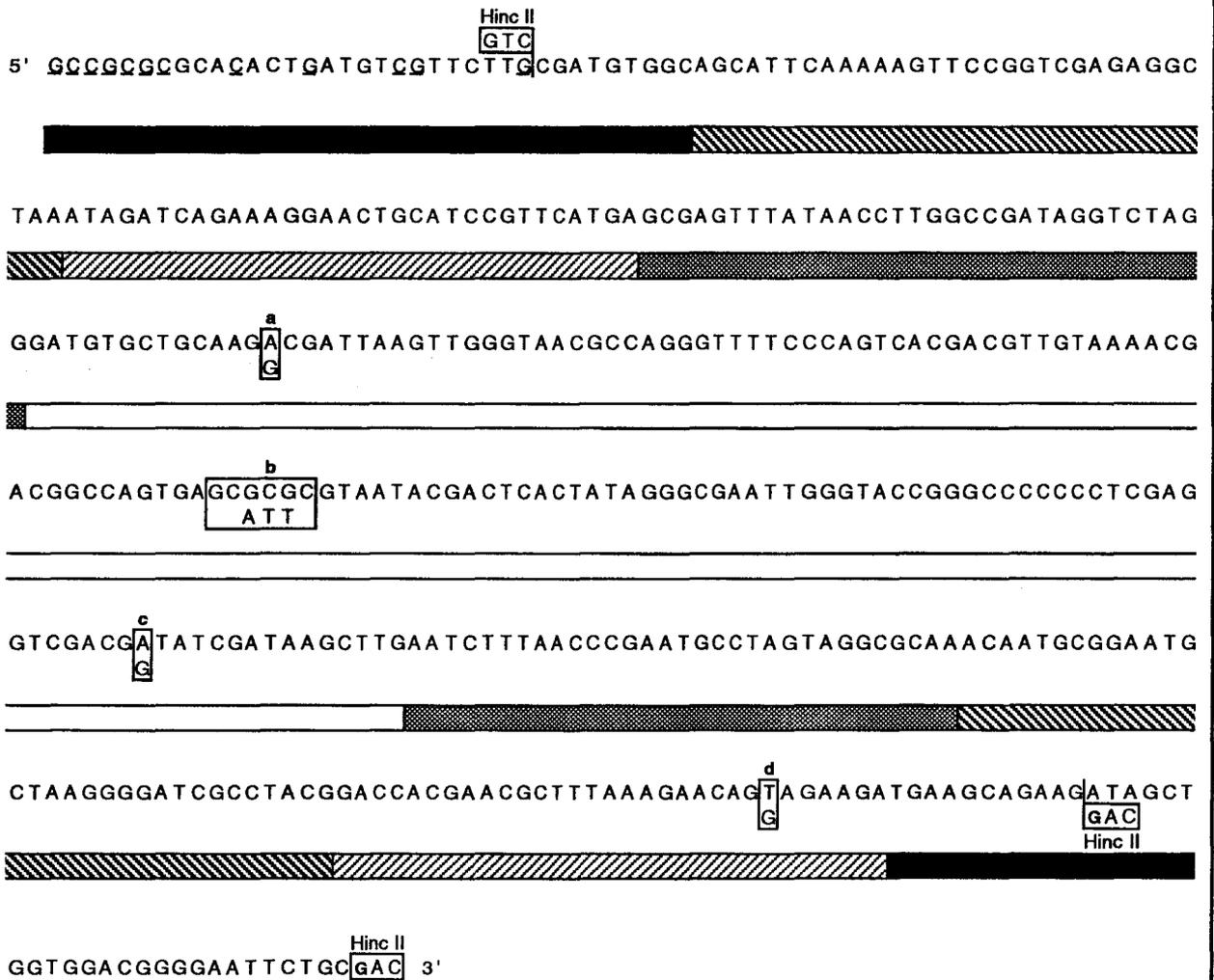
attendue (305 pb) et par divers produits aspécifiques de taille variable comprise entre 200 pb et 700 pb. Cependant, ce nombre de bandes aspécifiques a pu être maîtrisé par une réduction du nombre de cycles (35 au lieu de 45). Par contre, l'augmentation de la température d'appariement de 10 °C (60° au lieu de 50°C) ne présentait pas d'effet significatif en terme de diminution des appariements aspécifiques. Ceci peut s'expliquer par le fait que l'ensemble des produits issus de l'étape PCR B, même ceux non détectés après coloration au BET, possèdent tous à leurs extrémités une amorce du couple B. Ainsi, à l'étape PCR C, les amorces du couple C ont autant de chance de s'apparier avec la cible d'ADN légitime (la bande de 253 pb) qu'avec les bandes aspécifiques présentes dans la matrice non purifiée. La quatrième étape, qui utilise le produit réactionnel de la PCR C (figure 32 A, piste 5), ne permet pas d'identifier distinctement la bande de taille attendue. Tout se passe comme si les deux bandes majoritaires à 180 et 230 pb ont épuisé les réactifs d'amplification au détriment de la bande recherchée (357 pb). Ce phénomène s'explique d'une part par la présence dans la matrice de départ (PCR C) de produits aspécifiques de petite taille servant de matrice principale et d'autre part, par la préférence de l'enzyme à amplifier un fragment plus petit. Pour échapper à cet inconvénient, la solution était de partir d'une matrice purifiée et en l'occurrence ici de la bande 305 pb. Après purification sur gel de cette bande (figure 32 A, piste 6), le produit réactionnel de l'étape PCR D n'a toutefois pas permis d'obtenir la bande attendue (non illustrée). C'est après augmentation du nombre de cycle (40 au lieu de 35) que la bande de taille attendue (figure 32 A, piste 7, bande 357 pb) apparaissait à cette étape. La diminution de la température d'appariement (35°C au lieu de 60°C) n'apportait pas d'amélioration dans le rendement. Une deuxième étape de purification de la bande 305 pb permet d'augmenter l'intensité de la bande 357 pb (figure 32 B, piste 2). Cependant, quelque soient les conditions d'amplification, les bandes de petite taille épuisent le système d'amplification. C'est pourquoi, même deux étapes de purification sur gel d'agarose ne sont pas suffisantes pour supprimer complètement de la matrice les produits de taille non désirée. Afin de poursuivre la construction de la molécule standard, le séquençage du fragment 357 pb permit de s'assurer qu'il correspondait bien à la molécule attendue. Nous avons donc cloné la bande 357 pb dans le vecteur M13mp 18.

Après confirmation de la séquence (figure 33), cette nouvelle matrice, qui utilise l'insert cloné, a permis de produire, pour l'étape PCR E, le fragment attendu de 410 pb (figure 32 A, piste 8) sans rencontrer d'obstacles. Ce fragment a également été confirmé par séquençage (figure 33).

En résumé, seules les deux premières étapes de la construction (figure 32 A et B) ont respecté le schéma théorique. L'apparition dans les étapes suivantes de nombreux produits d'amplification ne permettaient plus d'identifier la bande attendue car cette

Figure 33 : Vérification de la séquence des clones n° 23 et n°5 par rapport à la séquence théorique de la molécule standard

Les inserts correspondant aux fragments PCR 357 et 410 pb ont été clonés en M13 mp 18 puis séquencés à l'aide de l'amorce universelle. Les bases mutées au niveau des positions a, b, c et d sont encadrées. Sur les trois bases (GAC) du site de clonage Hinc II qui doivent être conservées après ligation, seules les bases AC ont été retrouvées. La base G manquante a été représentée par une lettre majuscule en gras de taille plus petite (**G**). Les bases incertaines, c'est à dire qui n'ont pas pu être clairement identifiées lors de la lecture des autoradiographies, sont soulignées. Les motifs délimitent les séquences nucléotidiques des différents gènes insérés dans la construction.



Légende:

-  ARNr 18 S
-  Gène B 1 α
-  Gène B 1 β
-  Gène P 30
-  pBluescript SK (-)

dernière était noyée dans une traînée (figure 32 A, piste 5) de bandes aspécifiques. Le clonage des fragments les plus pertinents, du fait de leur taille et de leur séquençage, ont permis d'aboutir à la construction désirée (figure 33).

Au cours des différentes étapes de cette construction, il s'est produit un certain nombre de modifications vis-à-vis de la séquence attendue. On peut dénombrer trois mutations ponctuelles correspondant aux positions "a, c et d" (substitution de G par A ou T) au niveau du clone n° 23. Par contre, la mutation de la position "d" a été supprimée au cours de la PCR E par l'insertion de l'amorce 3' E. Ces mutations ont certainement été générées lors de l'élongation par la Taq polymérase elle-même. Le remplacement du triplet "AAT" par "GCGCGC" au niveau de la position "b" n'a certainement pas été produit par la polymérase, dans la mesure où les erreurs de polymérisation sont généralement plus ponctuelles. Nous supposons que cette séquence particulière doit être présente dans le vecteur pBluescript SK (-) commercialisé.

Pour améliorer le rendement de production de la molécule standard correspondant à l'étape PCR D, l'insert de 392 pb a été transféré du M13mp 18 dans le vecteur PUC 18. En effet, le rendement de purification d'un plasmide est nettement supérieur à celui d'un génome phagique double brin.

Après production du plasmide recombinant "PUC 18-insert 357 bp" et du phage recombinant sous sa forme double brin "M13mp 18-insert 410 pb" (l'insert de 410 pb a été inséré dans le vecteur de clonage M13mp 18 afin de favoriser son séquençage), nous avons vérifié que ces molécules standard, correspondant à deux étapes de construction (étapes PCR D et E), généraient, en fonction des différents couples d'amorces, les produits PCR de taille attendue (figure 34). De plus, ces produits devaient être de taille différente de ceux obtenus à partir de l'ADN génomique de *Toxoplasma gondii* (figure 35).

Ainsi, pour les couples d'amorces (5' P30/3' P30), (B1-1/B1-4), (B1-5/B1-7) et (A III/A IIc), nous avons obtenu respectivement les fragments 391, 287, 288 et 193 pb. La différence d'une pb entre ces fragments et ceux indiqués dans la figure 17 s'explique par le fait que la molécule de biotine est séparée de l'extrémité 5' de l'amorce par une base supplémentaire. Afin de mieux visualiser la bande de 391 pb, nous avons déposé 3/10 du produit réactionnel. Pour éviter d'obtenir des intensités trop fortes lors de la révélation par autoradiographie, les produits PCR correspondant aux pistes 10, 11 et 13 ont été dilués respectivement aux 1/20, 1/2 et 1/2. Ces différences d'intensité des fragments PCR pourraient s'expliquer par le fait que les conditions d'amplification

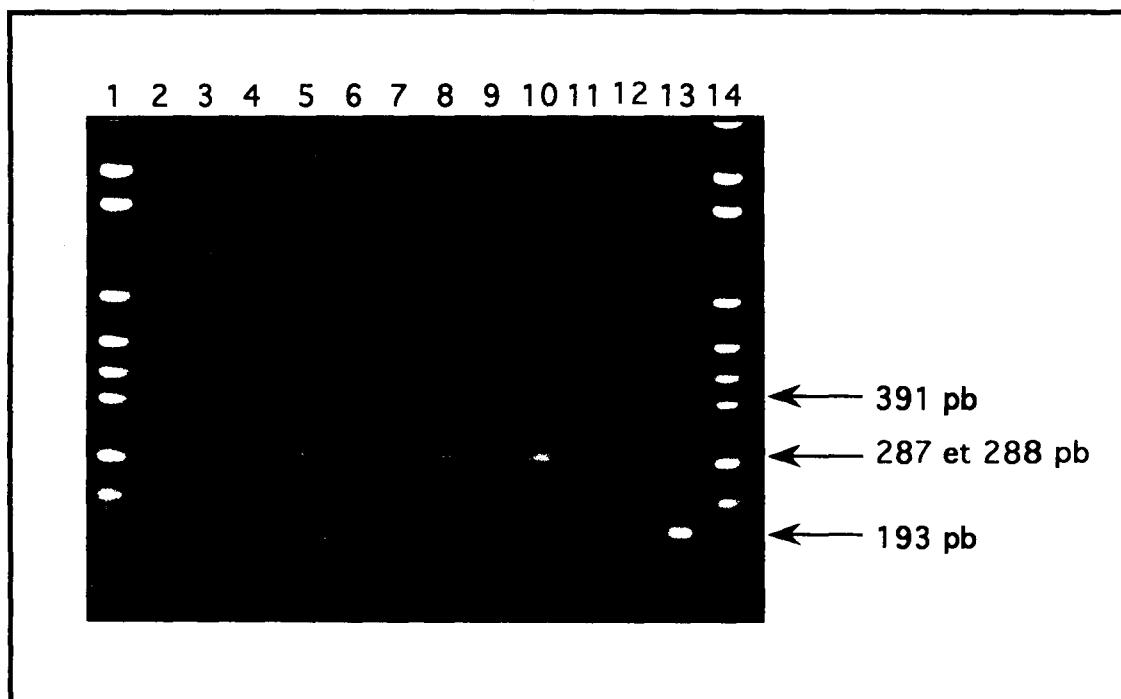


Figure 34 : Molécule standard (étape D et E) et produits PCR résultants

Les 35 cycles d'amplification à partir de 10 ng de matrice, ont été réalisés dans les conditions suivantes : 1 mn à 94°C de dénaturation, 30 s à 55°C d'appariement et 1 mn à 72°C d'élongation. Après amplification, les produits PCR sont séparés sur gel d'agarose 2% en TBE 1x sous un ampérage constant de 35 mA. La matrice utilisée est indiquée entre parenthèse (piste 2 à 13).

- Piste 1 et 14 : Poids moléculaire VI (Boehringer mannheim)
- Piste 2 : Couple d'amorces: 5' P30 et 3' P30 (M13 mp18-Insert E)
- Piste 3 : Couple d'amorces: 5' P30 et 3' P30 (eau)
- Piste 4 : Couple d'amorces: 5' P30 et 3' P30 (PUC 18-insert D)
- Piste 5 : Couple d'amorces: B1-1 et B1-4 (M13 mp18-Insert E)
- Piste 6 : Couple d'amorces: B1-1 et B1-4 (eau)
- Piste 7 : Couple d'amorces: B1-1 et B1-4 (PUC 18-insert D)
- Piste 8 : Couple d'amorces: B1-5 et B1-7 (M13 mp18-Insert E)
- Piste 9 : Couple d'amorces: B1-5 et B1-7 (eau)
- Piste 10 : Couple d'amorces: B1-5 et B1-7 (PUC 18-insert D)
- Piste 11 : Couple d'amorces: A III et A IIc (M13 mp18-Insert E)
- Piste 12 : Couple d'amorces: A III et A IIc (eau)
- Piste 13 : Couple d'amorces: A III et A IIc (PUC 18-insert D)

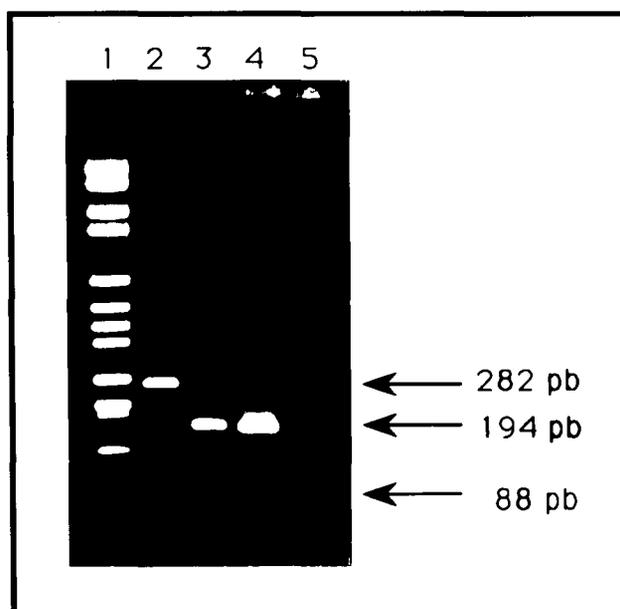


Figure 35 : Amplification d'ADN génomique de *Toxoplasma gondii*

Les conditions d'amplification identiques à celles indiquées dans la figure précédente, sont appliquées à 1 µg d'ADN génomique de *Toxoplasma gondii* (souche RH) purifié sur double gradient de CsCl. Les produits PCR sont séparés sur gel d'agarose 2% en TBE 1x.

piste 1 : poids moléculaires VI (Boehringer mannheim)

Piste 2 : Couple d'amorces 5' P30 et 3' P30

Piste 4 : Couple d'amorces B1-5 et B1-7

Piste 3 : Couple d'amorces B1-1 et B1-4

Piste 5 : Couple d'amorces A III et A IIc

choisies sont celles correspondant aux couples d'amorces (B1-5/B1-7) et de ce fait pourraient ne pas être optimales pour les autres couples d'amorces.

On notera que la matrice PUC 18-insert D n'est pas capable de produire le fragment de 391 pb (figure 34, piste 2) dans la mesure où cette molécule ne possède pas les séquences complémentaires du couple d'amorce (5' P30/3' P30).

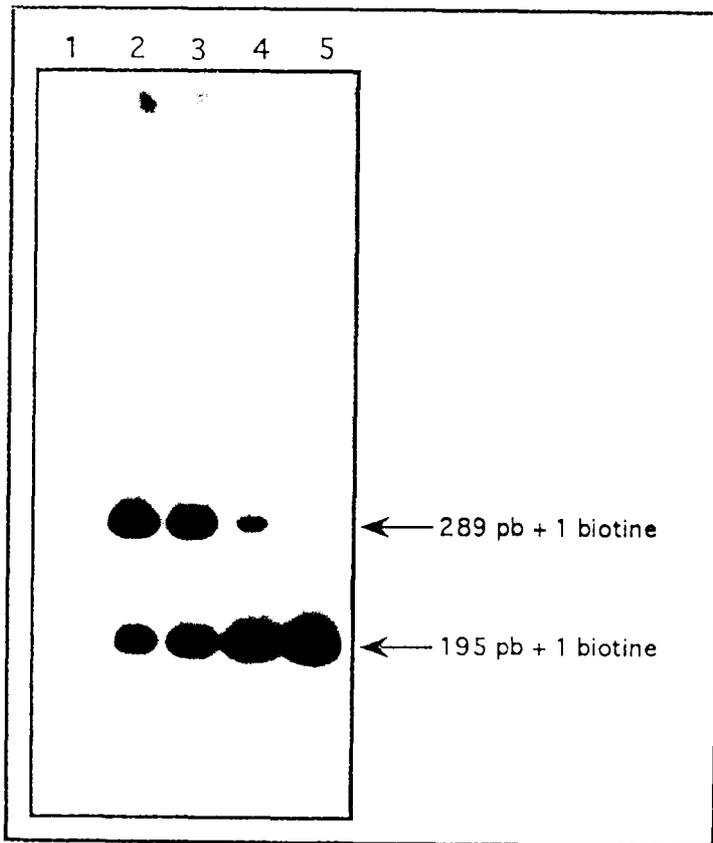
L'amplification d'ADN génomique à partir des différents couples d'amorces génère des fragments PCR de taille attendue. Ainsi, pour les couples d'amorces (5' P30/3' P30), (B1-1/B1-4), (B1-5/B1-7) et (A III/A IIc) nous avons obtenu respectivement les fragments 282, 194, 194 et 88 pb. Les différences de taille entre les produits obtenus à partir de la molécule standard et ceux obtenus avec l'ADN génomique sont donc respectivement 109, 93, 94 et 105 pb. Grâce à cette différence de taille, les produits PCR pour un couple d'amorces donné sont différenciables sur un gel d'agarose de 2%.

Il reste à vérifier, et en particulier pour le couple d'amorce (B1-5/B1-7), que cette différence de taille soit suffisante pour permettre de mesurer l'intensité des bandes (figure 36).

Le vecteur "PUC 18-insert D", dont la carte de restriction est représentée figure 37, était la première molécule étalon capable d'être produite en grande quantité (plasmide) tout en possédant les séquences complémentaires au couple d'amorces B1-5 et B1-7. L'utilisation de ce couple d'amorces nous semblait intéressante eu égard au rendement d'amplification. En effet, pour des conditions d'amplification identiques, le couple d'amorces B1-5 et B1-7 permet d'obtenir une quantité de produits PCR spécifiques plus importante qu'avec le couple d'amorces B1-1 et B1-3. La mise au point du modèle de PCR quantitative fut poursuivie à l'aide de cette construction.

Quelque soit la concentration du standard (figure 36, piste 2, 3, 4 et 5), les deux produits PCR sont bien individualisés. La bande la plus proche du puit de dépôt correspond au produit PCR issu de la molécule étalon. La bande la plus basse, spécifiquement reconnue par la sonde B1-6 (non illustré), est issue de la cible génomique, c'est à dire du gène B1. Le témoin négatif (figure 36, piste 1) permet de montrer que les amorces biotinylées, dans ces conditions de migration, sont sorties du gel.

Nous avons donc vérifié, pour des conditions de migration fixées, qu'une différence de taille de 94 pb était suffisante pour individualiser le fragment PCR issu de



Piste 1 : Témoin négatif eau
 Piste 2 : $1,5 \cdot 10^7$ molécules étalon
 Piste 3 : $7,5 \cdot 10^6$ molécules étalon
 Piste 4 : 10^6 molécules étalon
 Piste 5 : $7,5 \cdot 10^5$ molécules étalon

Figure 36 : Séparation des produits PCR (molécule étalon et cible génomique) sur gel d'agarose Nusieve 3%

Des quantités connues et fixes d'ADN génomique de tachyzoïte (soit $1 \mu\text{g}$ d'ADN équivalent à $1,17 \cdot 10^5$ copies du gène B1) sont mélangées à des quantités décroissantes de molécule standard ($1,5 \cdot 10^7$, $7,5 \cdot 10^6$, 10^6 ou $7,5 \cdot 10^5$ plasmides recombinants PUC 18-insert D). La quantité d'ADN ($1 \mu\text{g}$) utilisée pour effectuer l'amplification est estimée de la manière suivante : $2 \cdot 10^8$ tachyzoïtes : $150 \mu\text{L}$: $2000 \times 5 \mu\text{L} \times 8 \cdot 10^7 \text{ pb} \times 660 \text{ g/mole}$: $6,02 \cdot 10^{23}$ molécules/mole = $9,745 \cdot 10^{-7} \text{ g} = 0,97 \mu\text{g} = 1 \mu\text{g}$. $150 \mu\text{L}$ = volume de resuspension du culot d'ADN correspondant à $2 \cdot 10^8$ tachyzoïtes, 2000 = facteur de dilution, $5 \mu\text{L}$ = volume de solution d'ADN pour l'amplification, $8 \cdot 10^7 \text{ pb}$ = taille du génome d'un tachyzoïte, 660 g/mole = masse molaire d'une pb et $6,02 \cdot 10^{23}$ = nombre d'Avogadro sachant qu'ici 1 molécule est équivalente à un génome haploïde de tachyzoïte. La détermination du nombre de copie du gène B1 ($1,17 \cdot 10^5$) équivalent à $1 \mu\text{g}$ est détaillée à la fin du chapitre II des résultats (commentaire de la figure 43).

Après amplification (dénaturation: 45 s à 94°C , appariement: 30 s à 60°C et élévation : 1 mn à 72°C ; dénaturation initiale: 5 mn à 94°C ; 25 cycles), les produits PCR sont séparés sur gel d'agarose Nusieve 3% en TBE séquence 1x sous ampérage constant (35 mA). La migration du gel est arrêtée lorsque le bleu de Bromophénol a parcouru 12 cm. Les produits PCR transférés sur membrane de nylon sont révélés par chimioluminescence. L'autoradiographie ci-dessous est obtenue après 9 mn d'exposition.

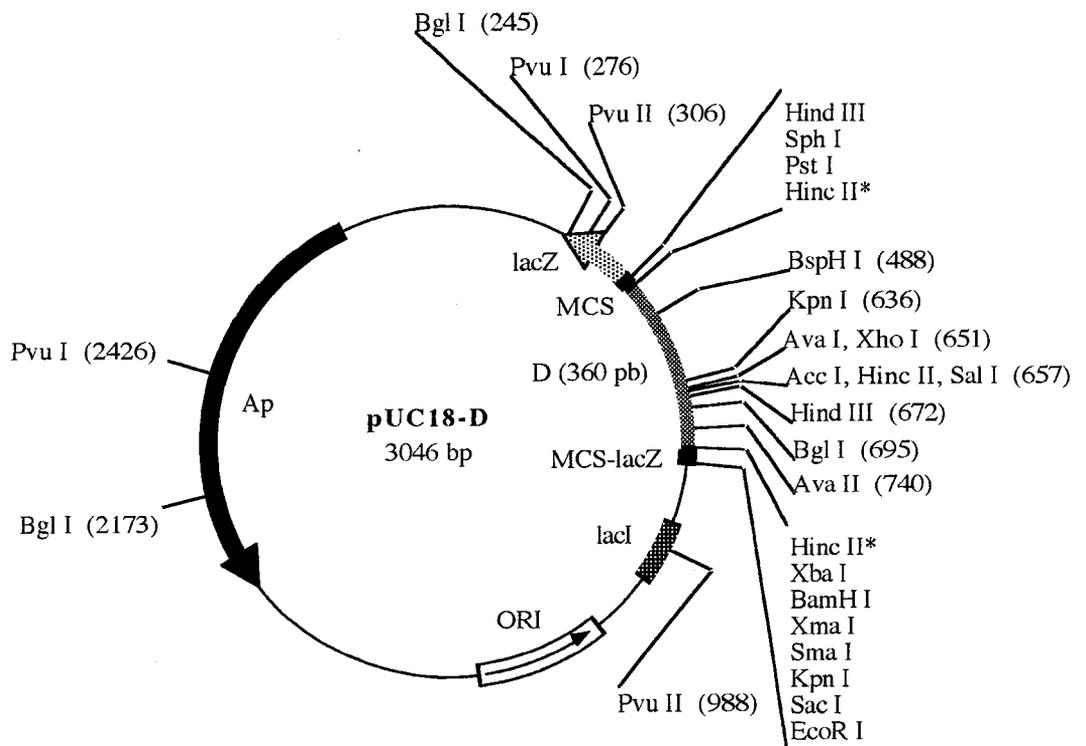


Figure 37 : Carte de restriction de la molécule étalon "PUC 18-Insert D"

La molécule étalon (3046 pb) correspond au sous-clonage de l'insert D (357 + 3 = 360 pb) dans le plasmide pUC 18 (2686 pb) au niveau du site de restriction Hinc II (MCS : Multi cloning site).

| | |
|--|---|
| lacZ : Gène lacZ (β -galactosidase) | D : Insert D |
| lacI : Gène lacI (represseur du gène lacZ) | ORI : Origine de réplication (<i>ColE1</i>) |
| Ap : Gène de resistance à l'ampicilline | Hinc II* : Site résiduel après clivage |

la molécule étalon de celui de la cible génomique. L'intensité de chacune de ces bandes était mesurable sans difficulté.

Afin d'évaluer le degré de corrélation entre les quantités d'ADN déterminées expérimentalement par rapport à leur valeur théorique attendue, un certain nombre de pré-requis étaient nécessaires.

Au cours de l'amplification, la vitesse de production de l'ADN évolue en deux phases. En phase dite exponentielle, la production est doublée en fin de chaque cycle. Puis la quantité produite ralentit pour tendre ensuite vers une quantité stable, quelque soit le nombre de cycles supplémentaires : c'est la phase de plateau. C'est pourquoi, si l'on rapporte le logarithme de la quantité produite en fonction du nombre de cycles, seule la phase exponentielle correspond à une droite.

D'après les études menées par Kourilsky (Pannetier *et al.*, 1993) pour déterminer une quantité d'ADN inconnue au delà de la phase exponentielle (phase de plateau), la molécule étalon et la cible doivent être strictement identiques en terme de séquence et leur différence de taille doit être inférieure à 10 pb. Or dans notre modèle, les fragments PCR issus de la cible génomique et de la molécule étalon présentent une différence de taille de l'ordre de 100 pb, il était donc impératif que les différentes concentrations du standard utilisé dans notre étude correspondent à des quantités maintenues en phase de croissance exponentielle et ceci pour des conditions d'amplification déterminées. Des essais préliminaires d'amplification sur une gamme de standard ont été effectués afin de déterminer les concentrations permettant de travailler en phase exponentielle.

En fonction de ce critère, la première gamme satisfaisante a été constituée de trois quantités différentes de molécule étalon (figure 38) correspondant théoriquement à 1000, 2000 et 5000 molécules. Sachant que la taille de la molécule standard était de 3046 pb, les quantités de 1000, 2000 et 5000 molécules correspondent respectivement à des quantités d'ADN de $3,34 \cdot 10^{-15}$ g, $6,68 \cdot 10^{-15}$ g et $1,67 \cdot 10^{-14}$ g ($3,34 \cdot 10^{-15}$ g x $6,02 \cdot 10^{23}$ molécules/mole : 660 g/mole : 3046 pb \approx 1000 molécules). Après amplification, les différentes quantités de molécules étalon correspondent à une intensité déduite à partir des bandes observées sur autoradiographie. Le Logarithme népérien (Log) de chacune des intensités est reporté sur un graphe en fonction du nombre de molécules étalon. Les valeurs expérimentales correspondantes se projettent alors sur une droite à partir de points alignés. Cet alignement confirmait que l'amplification était observée en phase exponentielle et ceci pour des conditions d'amplification de 35 cycles.

PRET ENTRE BIBLIOTHEQUES

Mme ou M. COTY

N° Réf. : 15120.1076

Reçu le 29 AVRIL 2002

Frais de port :Frs à régler à
réception ou facturé au service

Ouvrage

Thèse

- à rendre le 17/05/2002

Autre

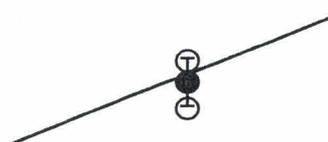
à consulter sur place jusqu'au

.....
Merci de laisser cette fiche dans l'ouvrage

BIBLIOTHEQUE DE L'UNIVERSITE DE ROUEN
Section Médecine-Pharmacie
22 bvd Gambetta
76183 rouen cedex
Tél. : 02 35 14 82 58 ou 57 Fax : 02 35 14 84 62

a 94 °C de dénaturation

Une étape de dénaturation de 5 mn à 94°C précède les 35 cycles. Après détermination de l'intensité des bandes sur l'autoradiographie, le Log (Standard) en fonction du Log (nombre de molécule étalon) est reporté. Les traits verticaux centrés par rapport aux points de la gamme moyenne correspondent à l'écart type. Les symboles cercle blanc et cercle noir correspondent respectivement aux points de la gamme et aux points moyens de la gamme (chaque point ayant été réalisé en double exemplaire).



○ Gamme, 35 cycles
● Moyenne

olécules

10000

pour 35 cycles d'amplification

lant à 5000, 2000 et 1000, molécules, sont
mplifiés dans les conditions suivantes : 45 s
appariement et 1 mn à 72°C d'élongation.

Une fois les concentrations de la gamme choisie (1000, 2000 et 5000 molécules, 35 cycles), l'amplification d'ADN de l'échantillon à analyser doit donner une quantité de produit PCR comprise entre les points extrêmes de la gamme. Pour l'échantillon, sa quantité d'ADN est déterminée grâce aux signaux produits par la gamme standard et par comparaison lorsque les intensités des signaux "inconnue versus standard" sont égales.

A partir de l'autoradiographie illustrée figure 36, nous observons qu'au niveau de la piste 2, l'intensité de la bande du bas (gène B1) est inférieure à celle de la bande du haut (standard), tandis que dans les pistes 4 et 5 c'est l'inverse. Par contre piste 3 les bandes sont d'intensité quasiment identique. Toutefois, un ajustement du facteur de dilution de l'ADN de l'échantillon, pour se rapprocher des quantités de la gamme étalon, est nécessaire.

Les premiers essais de quantification de la charge parasitaire (kystes/souche Prugniaud) au niveau de cerveaux de souris sont illustrés par l'autoradiographie de la figure 39 et par la figure 40.

L'origine de la charge parasitaire utilisée, dans un premier temps, a consisté en des bradyzoïtes provenant de kystes cérébraux. Ce matériel biologique a eu l'énorme avantage de nous permettre de réaliser la mise au point des conditions d'extraction d'ADN génomique total issu de cerveaux enkystés, c'est à dire correspondant à de l'ADN de bradyzoïtes mélangé à de l'ADN de souris. Ainsi, nous pouvions directement appliquer ces techniques à l'étude d'un modèle de toxoplasmose cérébrale chez l'animal.

Un comptage manuel de kystes à partir de cerveaux de souris infectés est présenté dans le tableau 2. Il existe pour les cerveaux n°2, 5, 7 et 10 une corrélation entre la dose infestante et le nombre de kystes par cerveau. Les cerveaux n° 1 et 6 sont des témoins négatifs de l'infestation. Les cerveaux n°3 et 8 présentent un nombre faible de kystes par rapport à la dose infestante ; par contre, dans le cerveau n°4 aucun kyste n'a été visualisé. Le cerveau n°9 comparé au cerveau n° 10, contient un nombre de kystes nettement supérieur. Ces observations ne sont pas surprenantes. En effet, dans certains organes, dont le cerveau, la charge parasitaire obtenue après infection de l'animal (Souris OF1/Souche parasitaire Prugniaud par exemple) n'est pas toujours directement proportionnelle à la charge parasitaire d'infection (Zenner *et al.*, 1999). De même, la charge parasitaire maximale n'entraîne pas toujours les lésions tissulaires les plus importantes. De plus, l'absence de kystes observée dans le cerveau n°4 peut être dûe au manque de sensibilité de la technique utilisée : comptage visuel au microscope photonique. Nos résultats sont donc concordants avec les observations publiées. Une partie de ces cerveaux a été analysée par notre technique de PCR quantitative.

**Figure 39 : Séparation des produits PCR (molécule étalon et cible génomique)
sur gel d'agarose NueSieve 3%**

Chaque préparation d'ADN équivalent à un demi cerveau est reprise dans 200 μ l final d'eau (solution mère). Dans le cas du cerveau n°10, le mélange réactionnel d'amplification (50 μ l) contient 5 μ l de matrice (solution mère diluée au 1/50 000) et de 5 μ l de solution standard équivalent dans le mélange réactionnel à 1 000, 2 000 ou 5 000 molécules. Chacun des 35 cycles est constitué d'une étape de dénaturation de 45 s à 94°C, d'une étape d'appariement de 30 s à 60°C et d'une étape d'élongation de 1 mn à 72°C. Une étape de dénaturation de 5 mn à 94°C précède le premier cycle. Avant d'être introduite dans le milieu réactionnel, la matrice mélangée au standard est conservée dans la glace après une dénaturation de 10 mn à 95°C.

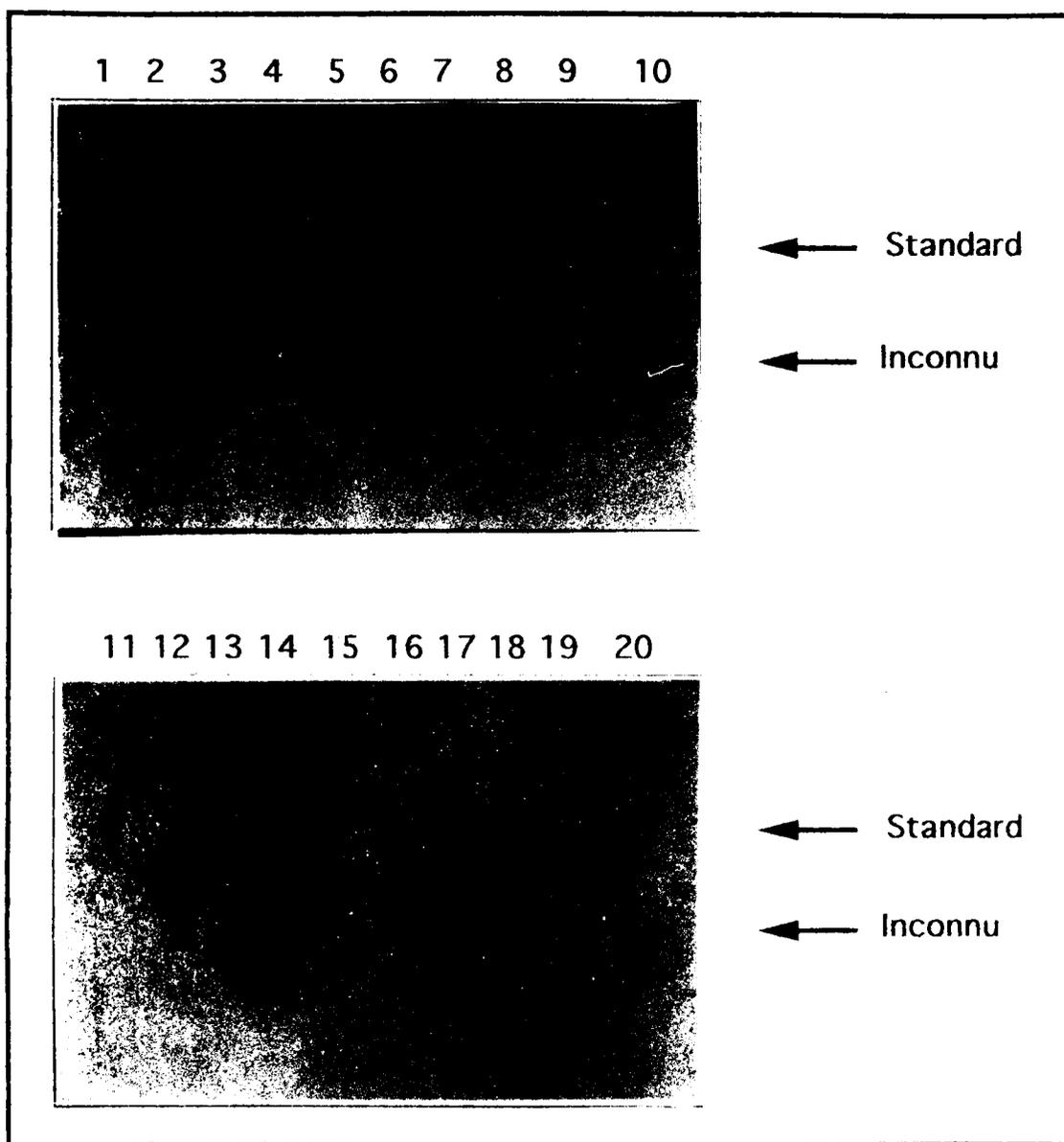
Après amplification, les produits PCR sont séparés sur gel d'agarose NueSieve 3% en TBE séquence 1x sous ampérage constant (35 mA). La migration du gel est arrêtée lorsque le bleu de bromophénol a parcouru 12 cm. Les produits PCR transférés sur membrane de nylon sont révélés par chimioluminescence. L'autoradiographie ci-dessous est obtenue après 15 mn d'exposition.

Piste 1,4, 7, 11, 14 et 17 : 5000 molécules étalon,

Piste 2, 5, 8, 12, 15 et 18 : 2000 molécules étalon

Piste 3, 6, 9, 13, 16 et 19 : 1000 molécules étalon

Piste 10 et 20 : Témoins négatifs (eau)



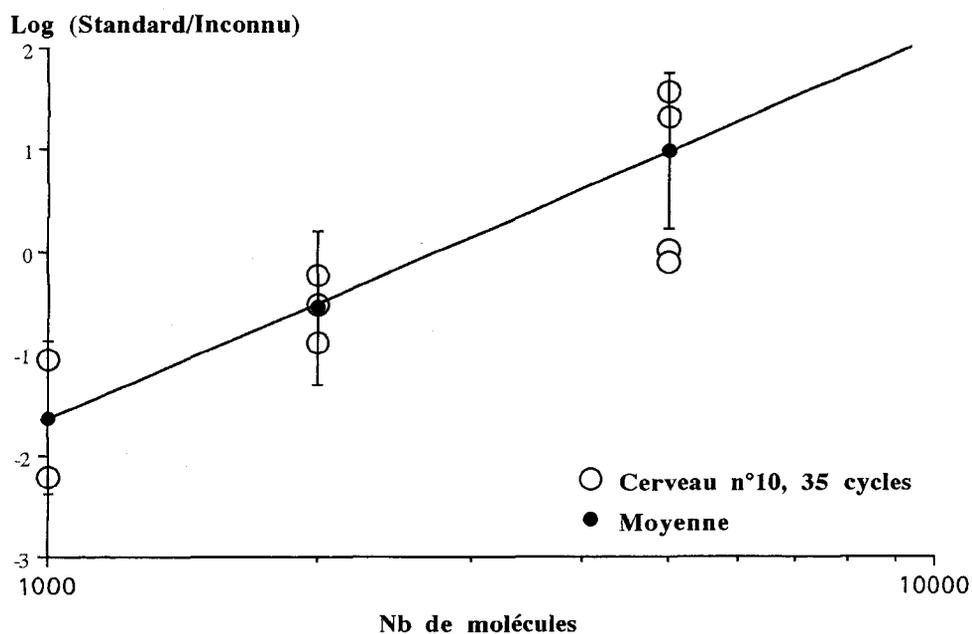


Figure 40 : Quantification du nombre de bradyzoïtes présents dans le cerveau n°10

Après détermination à l'aide d'un chromoscan (voir matériel et méthodes), de l'intensité de chacune des bandes présentes sur l'autoradiographie correspondant à la figure 39, le rapport $\text{Log (Standard/Inconnu)}$ est reporté en fonction du $\text{Log (nombre de molécules du Standard)}$.

Tableau 2 : Comptage manuel de kystes dans des cerveaux de souris

Chaque souris infestée (BALB/C ou C 57 Bl/6) par voie intrapéritonéale, reçoit une dose infestante variant entre 0 et 10 000 tachyzoïtes (souche Prugniaud). Les cerveaux récupérés au bout de 2 mois sur des souris sacrifiées, sont préparés comme décrit dans le matériel et méthodes. Ainsi, un demi-cerveau correspond à un volume final de broyat équivalent à 750 μ l. Chaque aliquot de 10 μ l est ensuite déposé entre lame et lamelle puis le nombre de kyste est déterminé par comptage au microscope photonique. La charge parasitaire présente dans le demi-cerveau restant sera quant à elle déterminée par PCR quantitative pour être ensuite comparée à celle obtenue par comptage manuel.

| Souris (souche) | Cerveau | Dose infestante de Tachyzoïtes (Prugniaud) | Nombre de Kystes comptés | Volume de comptage (μl) | Nombre de kystes comptés par cerveau |
|-----------------|---------|--|--------------------------|-------------------------|--------------------------------------|
| BALB/C | n°1 | 0 | 0 | 40 | 0 |
| | n°2 | 100 | 5 | 80 | 94 |
| | n°4 | 100 | 0 | 100 | 0 |
| | n°3 | 10000 | 9 | 100 | 135 |
| | n°5 | 10000 | 37 | 20 | 2775 |
| C 57 BI/6 | n°6 | 0 | 0 | 20 | 0 |
| | n°7 | 100 | 2 | 80 | 37 |
| | n°9 | 100 | 43 | 40 | 1612 |
| | n°8 | 10000 | 3 | 80 | 56 |
| | n°10 | 10000 | 31 | 40 | 1162 |

Pour cette expérience de quantification d'une charge parasitaire connue, nous disposions au départ de 7 cerveaux avec kystes (cerveaux n°2, 3, 5, 7, 8, 9 et 10). Pour commencer notre étude, nous avons choisi d'analyser celui qui possédait un nombre de kystes se rapprochant le plus du nombre moyen de kystes ($839 = (94 + 135 + 2775 + 37 + 1612 + 56 + 1162) : 7$), c'est à dire le cerveau n°10 (nombre de kystes = 1162). Pour la gamme, nous avons sélectionné 3 quantités différentes de molécules étalon (1000, 2000 et 5000), chacune étant testée en 6 exemplaires.

Tous les produits d'amplification n'ont pas permis au niveau de l'autoradiographie (figure 39) de visualiser la bande correspondant au standard et à l'inconnu. Seules les pistes 5, 7, 9, 14 et 17 possèdent après un temps de révélation de 15 mn les deux bandes nécessaires à la détermination du rapport Log (Standard/Inconnu). Les pistes 4, 6, 12, 13, 16 et 18 sont caractérisées par une seule bande, soit la bande du haut pour le standard, soit la bande du bas pour l'inconnu. Un temps de révélation plus important (45 mn) permettra de révéler la deuxième bande des pistes 4, 13, et 16 et les deux bandes de la piste 2. Dans le cas des pistes 6, 12 et 18, la deuxième bande n'a jamais été visualisée. Et pour les pistes 1, 3, 9, 11, 15 et 19, aucune bande n'est apparue quelque soit le temps de révélation. Ainsi, 50% des mélanges réactionnels (9 sur 18) n'ont pu être exploités (pistes 1, 3, 6, 9, 11, 12, 15, 18 et 19).

Les 9 points qui ont permis de déterminer un rapport Log (Standard/Inconnu) se répartissent en 4 points pour le standard à 5000 molécules, en 3 points pour le standard à 2000 molécules et en 2 pour celui à 1000 molécules. Ce qui nous a permis de tracer la courbe étalon et d'en déduire le rapport pour lequel la quantité du nombre de copies du gène B1 (inconnu) est égale à celle du nombre de molécules étalon.

La courbe résultante de la moyenne des points est une droite (figure 40). Nous pouvons donc estimer le nombre de copies du gène B1 présent dans le mélange réactionnel à un équivalent de 2800 molécules étalon ($y = 0 \Rightarrow x = 2800$). Nous en déduisons que le nombre de bradyzoïtes contenus dans le cerveau 10 est de $3,2 \cdot 10^8$. Ce nombre est calculé de la manière suivante : $2800 \times 50\,000 \times 200 \mu\text{L} \times 2 : 5 \mu\text{L} : 35 = 3,2 \cdot 10^8$ (2800 = nombre de molécules étalon = nombre de copies du gène B1, 50 000 = facteur de dilution de la solution mère, 200 = volume de resuspension de l'ADN génomique total issu d'un demi-cerveau, 2 pour un cerveau complet, 5 = volume de solution mère amplifié et 35 le nombre de répétition du gène B1 dans un génome haploïde de bradyzoïte).

En prenant un nombre moyen de bradyzoïtes par kyste de 3000, nous estimons le nombre de kystes présents dans le cerveau n°10 à $1,07 \cdot 10^5$. En comparant ce nombre de kystes à celui déterminé par comptage manuel, la charge parasitaire quantifiée par PCR, est surestimée d'un facteur de 92 ($1,07 \cdot 10^5 / 1162 = 92$).

Ces résultats pourraient être améliorés notamment si nos PCR quantitatives avaient été plus reproductibles. En effet, pour une dilution donnée, la moyenne ne pouvait être calculée dans le meilleur des cas que sur 4 valeurs au lieu de 6 (en raison de l'absence d'une, voire, des deux bandes). De plus, 50% des réactions ne nous permettaient pas de calculer le rapport Standard sur Inconnu. Le problème de non reproductibilité rencontré lors de la quantification de la charge parasitaire du cerveau n°10 (figure 40) pourrait être lié à la très faible quantité de molécules constituant la gamme.

Nous avons émis l'hypothèse que l'engagement des molécules cibles lors des premiers cycles d'amplification avait une répercussion importante sur la quantité finale des produits PCR. Par exemple, si le standard se composait d'une seule molécule, la quantité finale dépendrait alors du cycle à partir duquel cette molécule débiterait son amplification. Par contre, si au départ, le standard était constitué de 1000 molécules, alors les quelques molécules qui s'engageraient tardivement auraient beaucoup moins de répercussion sur le résultat final. Pour cette raison, nous avons décidé d'augmenter les concentrations de la gamme de standard. Cependant, pour éviter de sortir de la phase exponentielle, il a fallu également revoir les conditions d'amplification en réétalonnant le nombre de cycles à ne pas dépasser (figure 41).

Les quatre points de cette gamme testés pour 25 cycles (figure 41), sont alignés. Cette gamme sera donc aliquotée et utilisée dans la poursuite de notre étude (figure 42). Les quatre points de chaque série pris séparément ne sont pas parfaitement alignés mais ces résultats sont en accord avec les observations décrites par Peccoud (Peccoud, 1993). Dans ses travaux, il utilise une gamme de 10 dilutions d'un étalon (S) qui, mélangées à une quantité d'échantillon à doser (E), est amplifiée pendant 25 cycles. Il observe, en reportant le Logarithme de la quantité de produits PCR issus de l'étalon avec le Logarithme de la quantité initiale d'étalon, que le rendement d'amplification est constant au cours des 25 cycles pour un mélange donné, mais varie aléatoirement d'un mélange à l'autre entre 60 et 90%. Ce qui se traduit par une succession de points imparfaitement alignés.

Dans le cas de l'étude du cerveau n°9 (figure 42), les trois points représentant la moyenne sont parfaitement alignés. De même pour chacun des points, la valeur de l'écart type est satisfaisante. La valeur ($\text{Log } 1 = 0$, $x = 1,6 \cdot 10^6$ molécules) pour laquelle le nombre de molécules du standard est égale à celui de l'inconnu permet, à partir de la droite, de déterminer le nombre de bradyzoïtes présents dans le cerveau n°9. Ce nombre, pour un cerveau entier, est estimé à $3,6 \cdot 10^8$ bradyzoïtes ($1,6 \cdot 10^6 : 35 : 5 \mu\text{L} \times 100$ (facteur de dilution) $\times 200 \mu\text{L} \times 2$). Si l'on rapporte ce nombre moyen de bradyzoïtes à un nombre moyen de kystes (3000 bradyzoïtes/kyste), on estime alors pour le cerveau n°9,

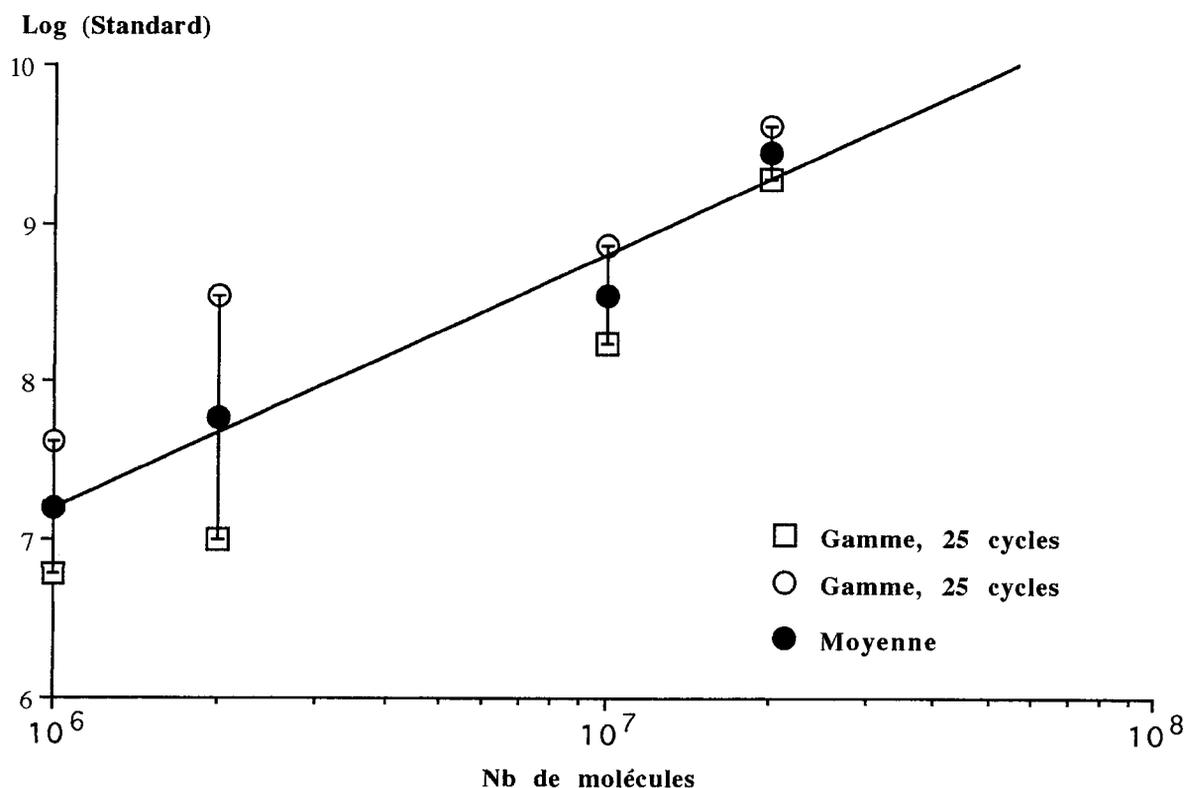


Figure 41 : Sélection d'une nouvelle gamme pour 25 cycles d'amplification

5 μ l de solution standard correspondant à 2×10^7 , 10^7 , 2×10^6 et 10^6 molécules, sont additionnés au mélange réactionnel puis amplifiés dans les conditions suivantes : 45 s à 94°C de dénaturation, 30 s à 60°C d'appariement et 1 mn à 72°C d'élongation. Une étape de dénaturation de 5 mn à 94°C précède les 25 cycles. Après détermination de l'intensité des bandes sur l'autoradiographie, le Log (Standard) en fonction du Log (nombre de molécules Standard) est reporté. Les traits verticaux centrés par rapport aux points de la gamme moyenne correspondent à l'écart type. Chaque symbole (cercle et carré) correspond aux points déterminés dans deux séries d'amplification réalisées avec la même gamme.

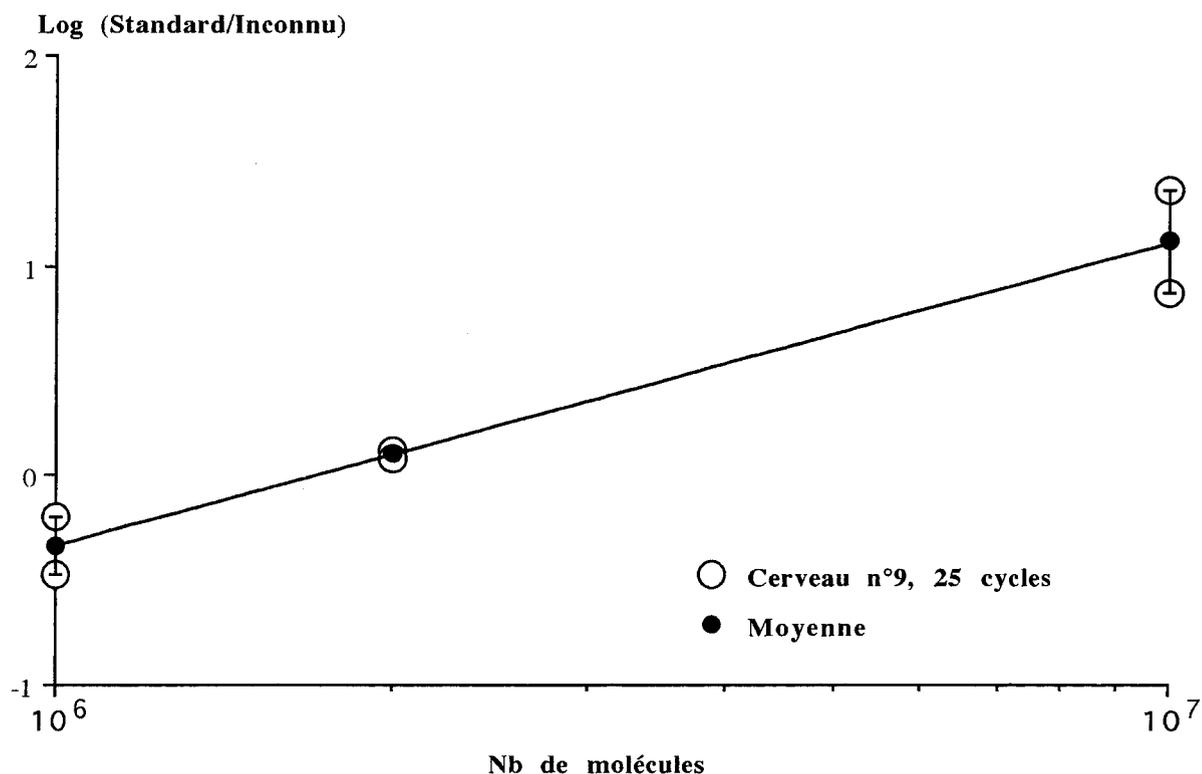


Figure 42 : Quantification du nombre de bradyzoïtes présents dans le cerveau n°9

Les conditions d'amplification sont identiques à celles décrites pour l'étude du cerveau n°10 (figure 26). Par contre, le nombre de cycle passe de 35 à 25 cycles de même que le facteur de dilution de la solution mère est passé de 50 000 à 100. Les points constituant la gamme passent respectivement de 1 000, 2 000 et 5 000 à 1 000 000, 2 000 000 et 10 000 000 molécules. Chaque point de quantification est ramené à 2 exemplaires au lieu de 6 dans la mesure où tous les mélanges réactionnels permettent d'obtenir les deux bandes attendues nécessaires pour la détermination de chaque point de la courbe.

le nombre de kystes à $1,2 \cdot 10^5$. Si l'on compare cette valeur avec celle obtenue par comptage manuel, il existe un facteur d'erreur de 75 ($1,2 \cdot 10^5/1612$).

La concordance n'est pas encore obtenue. La quantité de molécules standard doit être la plus précise possible. En purifiant le vecteur recombinant sur double gradient de chlorure de césium, on pourrait éventuellement éliminer des traces d'ADN bactérien contaminantes qui auraient pu fausser les mesures par absorbance de la concentration d'étalon. D'autre part, le dénombrement théorique de bradyzoïtes par kystes pourrait constituer un facteur d'erreur. Une nouvelle gamme a été préparée à partir d'un vecteur purifié. Un échantillon test constitué d'une quantité connue de tachyzoïtes, plus facile à dénombrer, a été réalisé (figure 43).

A partir de la droite correspondant à la quantification d'une charge connue de tachyzoïtes (figure 43), la valeur de x pour $y = 0$ est estimée à $2,2 \cdot 10^6$ molécules (1 molécule = 1 copie du gène B1). En tenant compte du volume de resuspension du culot d'ADN (150 μ L), du facteur de dilution de la solution d'ADN (1/2000), du volume utilisé pour l'amplification (5 μ L) et de la répétition du gène B1 (35 copies par génome haploïde), nous en déduisons que la solution mère analysée correspond à $37,7 \cdot 10^8$ tachyzoïtes ($2,2 \cdot 10^6 \times 150 \times 2000 : 5 : 35 = 37,7 \cdot 10^8$ tachyzoïtes, 35 copies du gène B 1 = 1 génome haploïde = 1 tachyzoïte). En comparant cette valeur avec celle obtenue après comptage en cellule Thomas, nous constatons qu'il existe encore un facteur d'erreur d'environ 19 ($37,7 \cdot 10^8$ tachyzoïtes/ $2 \cdot 10^8$ tachyzoïtes). Ce facteur d'erreur résiduel peut être attribué à la somme des erreurs commises lors des mesures de concentration des solutions mères (Absorbance, cellule Thomas), mais aussi lors de la préparation du matériel à quantifier (facteur de dilutions successives).

Nous proposons pour la poursuite des travaux, d'utiliser toujours la même gamme étalonnée par comparaison avec une concentration parasitaire donnée, pour comparer un un cerveau par rapport à un autre avec le minimum de risques de variations.

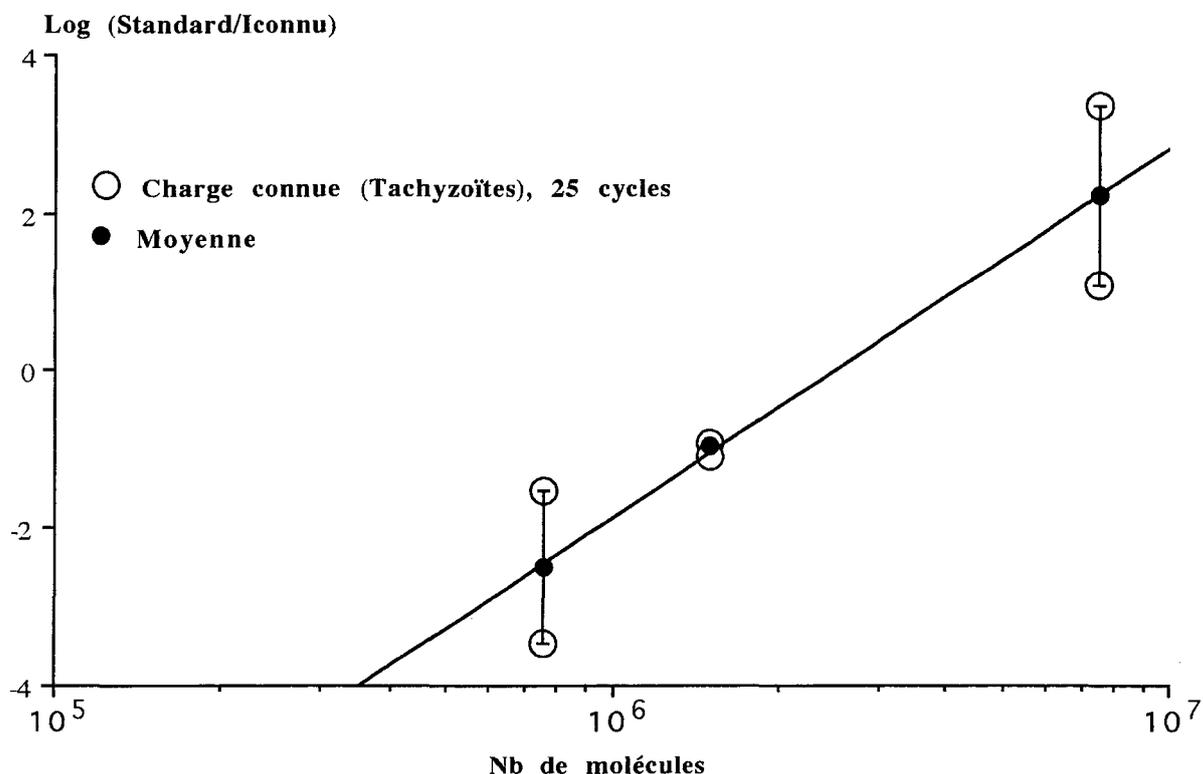


Figure 43 : Quantification d'une charge connue de tachyzoïtes à partir d'un plasmide étalon purifié sur double gradient de CsCl

La concentration de la solution de tachyzoïtes a été déterminée à partir d'un comptage sur cellule Thomas. La préparation du culot d'ADN correspondant à 2×10^8 tachyzoïtes, a été reprise dans un volume final de $150 \mu\text{l}$. Les conditions de quantification sont identiques à celles décrites dans la figure 28 (cerveau n°9). Par contre, les points utilisés de la gamme correspondent à 750 000, 1 500 000 et 7 500 000 molécules (1 molécules \Leftrightarrow 1 copie du gène B1).

III) ANALYSE PAR PCR DE L'EXPRESSION GENIQUE CHEZ *TOXOPLASMA GONDII*

A) Etude du gène *SAG3* :

La toxoplasmose est une affection chronique caractérisée par une immunité non stérilisante. De nombreux auteurs pensent que cette immunité durable pourrait être maintenue grâce à l'expression d'épitopes communs entre les différents stades d'évolution parasitaire. La recherche de ce type d'épitopes, et par conséquent de motifs communs présents au niveau de molécules spécifiques de *Toxoplasma gondii* présentent un intérêt indéniable dans la conception d'une immunoprophylaxie efficace. Ce sont les travaux de Darcy (Darcy *et al.*, 1990) qui décrivent quatre antigènes de tachyzoïtes (63, 43, 39 et 28,5 kDa) reconnus par des sérum dirigés contre des extraits de bradyzoïtes. Ils mettent également en évidence une molécule de 43 kDa de bradyzoïtes reconnue par des sérums dirigés contre des tachyzoïtes. Ces travaux ont été confirmés par Tomavo (Tomavo *et al.*, 1991) qui démontre la présence de deux antigènes de surface (P43 et P23) communs aux bradyzoïtes et tachyzoïtes.

Nos travaux, reportés dans la publication suivante "**Similarities between the primary structures of two distinct major surface proteins of *Toxoplasma gondii***" (Cesbron-Delauw *et al.*, 1994) ont permis d'approfondir certains points concernant la caractérisation moléculaire du gène *SAG3* (P43) et son expression au cours des différents stades invasifs du parasite.

La présence de la protéine P43 à la surface des tachyzoïtes et des bradyzoïtes avait été mis en évidence par une étude sérologique. Nous voulions conforter ces résultats en démontrant également l'expression de son gène (*SAG3*). Pour cela, il nous fallait révéler la présence de l'ARNm au niveaux de ces deux stades.

Les premiers essais de détection en utilisant la technique de référence, le "Northern blot" n'ont pas permis d'aboutir à un résultat. Nous avons donc décidé d'utiliser une technique beaucoup plus sensible : La RT-PCR.

Grâce à l'apport de cette technique, nous avons montré que le gène *SAG3* était exprimé à tous les stades invasifs (figure 44).

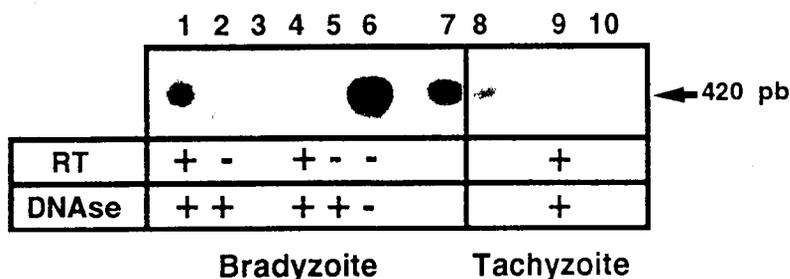


Figure 44 : Expression du gène *SAG3* aux stades tachyzoïte et bradyzoïte.

Les produits RT-PCR ont été hybridés avec une sonde interne spécifique marquée au ^{32}P après transfert sur une membrane de nitrocellulose par la technique "Southern blot". Les séquences des oligonucléotides correspondant aux couples d'amorces et à la sonde interne sont reportées dans le matériel et méthodes de l'article, de même que la préparation des ARNm et les conditions d'amplification. Les produits d'amplification ont été dilués au 1/200 avant leur séparation sur gel d'agarose par électrophorèse. Les signes + ou - indiquent si l'échantillon a été traité avant amplification à la reverse transcriptase (RT) et à l'ADNase I (DNase). La taille du produit PCR attendu est de 420 paires de bases comme précisé sur le côté droit de la figure. Les différentes pistes numérotées de 1 à 10 indiquent la nature de la matrice amplifiée et le nombre de cycles d'amplification.

La piste 2 comparée à la piste 6 permet de vérifier la dégradation de l'ADN génomique résiduel contaminant la préparation d'ARN totaux. Les pistes 4 et 5 permettent de s'assurer qu'aucune amplification aspécifique pour le couple d'amorces *SAG3* ne se produit à partir d'ADN ou d'ARN issus du génome murin. Les témoins positifs confirment que l'absence de produits d'amplification n'est pas lié à une déficience de l'enzyme (Taq polymérase). Les témoins négatifs permettent de vérifier l'absence de contaminants dans les solutions constituant le mélange réactionnel d'amplification.

Piste 1 : 2 μg d'ARN totaux de cerveau de souris infecté chroniquement (bradyzoïte), 45 cycles

Piste 2 : 2 μg d'ARN totaux de cerveau de souris infecté chroniquement (bradyzoïte), 45 cycles

Piste 3 : témoin négatif (eau), 45 cycles

Piste 4 : 2 μg d'ARN totaux de cerveau de souris saine, 45 cycles

Piste 5 : 2 μg d'ARN totaux de cerveau de souris saine, 45 cycles

Piste 6 : 2 μg d'ARN totaux de cerveau de souris infecté chroniquement (bradyzoïte), 45 cycles

Piste 7 : témoin positif (1 μg d'ADN génomique de tachyzoïte), 45 cycles

Piste 8 : témoin positif (1 μg d'ADN génomique de tachyzoïte), 35 cycles

Piste 9 : 1 μg d'ARN totaux de tachyzoïte, 35 cycles

Piste 10 : témoin négatif (eau), 35 cycles

Une expérience supplémentaire a permis de compléter les caractéristiques moléculaires du gène *SAG3*. La figure 45 illustre ainsi la détermination du nombre de copies du gène par génome haploïde. Celui-ci est décrit comme un gène unique.

Ces expériences nous permettent de conclure que le gène *SAG3* d'une part est codé par un gène unique et d'autre part qu'il est exprimé aussi bien au stade tachyzoïte qu'au stade bradyzoïte.

B) Etude de la corrélation entre "virulence et expression génique" par PCR quantitative sur ARN

La virulence des souches de toxoplasmes isolées dans la nature peut être très variable. Généralement, la virulence d'une souche augmente après des passages répétés en laboratoire. L'augmentation de cette virulence dépend de l'espèce animale (une même souche peut devenir progressivement virulente chez la souris tout en restant avirulente sur des embryons de poulet).

Les tentatives de caractérisation de la virulence portée par des antigènes différents sur les souches avirulentes et très virulentes ont été pour la plupart des échecs. Par contre, l'étude effectuée par Ware (Ware et Kasper, 1987) concernant des antigènes spécifiques pour 3 souches de *Toxoplasma gondii*, a permis de montrer des différences antigéniques qualitatives et quantitatives sur un certain nombre d'antigènes majeurs du parasite. Ces différences ont été confirmées par une analyse en "Western-Blot". Ces observations confortent l'idée que la virulence de certaines souches du toxoplasme peut être corrélée à une modification de la production de protéines particulières.

Nous avons envisagé d'étudier une implication possible des protéines GRA dans l'acquisition du caractère virulent de certaines souches du toxoplasme. Ces protéines GRA (composants des granules denses), stockées dans les organelles de sécrétion de *Toxoplasma gondii*, sont sécrétées dans la vacuole parasitophore lors de l'invasion de la cellule-hôte par le parasite. A l'interface entre le protozoaire et la cellule qui l'abrite, elles pourraient jouer un rôle primordial pour la survie, la multiplication intracellulaire voire dans le degré de virulence du toxoplasme.

Parmi les molécules GRA, GRA2 est certainement un très bon candidat d'étude dans la mesure où cet antigène est exprimé aussi bien au stade invasif du parasite (tachyzoïte) qu'au stade quiescent (bradyzoïte) contenu dans les kystes.

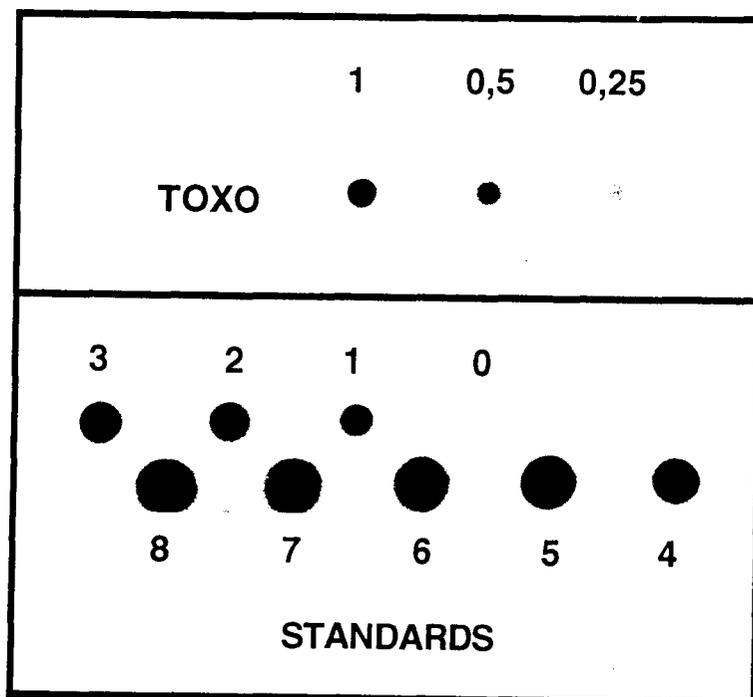


Figure 45 : Détermination du nombre de copies du gène *SAG3* dans un génome haploïde

Le nombre de copies du gène *SAG3* a été déterminé par hybridation comparative. Nous avons utilisé une gamme étalon constituée de quantités variables d'un insert ADNc de 1500 paires de bases dilués (clone L43 15 décrit dans la publication) dans 1 µg d'ADN génomique fragmenté par sonication. Chaque échantillon a été déposé sur membrane de nylon par la technique du "Dot blot" comme décrit dans le matériel et méthodes. La membrane est ensuite hybridée avec une sonde spécifique correspondant à l'insert d'ADNc double brin (1500 pb) marqué au ^{32}P . Chaque dépôt "standard" est repéré par un chiffre qui correspond au nombre de copies du gène *SAG3* par génome haploïde et par µg d'ADN génomique. "Toxo et Standard" indiquent respectivement ADN génomique de tachyzoïtes et points de la gamme étalon.

Chiffre 1 (Toxo) : 1 µg d'ADN génomique de tachyzoïtes

Chiffre 0,5 : 0,5 µg d'ADN génomique de tachyzoïtes

Chiffre 0,25 : 0,25 µg d'ADN génomique de tachyzoïtes

Chiffre 0 (Standard) : 0 pg d'insert ADNc double brin Chiffre 1 : 20 pg d'insert ADNc double brin

Chiffre 2 : 40pg d'insert ADNc double brin Chiffre 3 : 60 pg d'insert ADNc double brin

Chiffre 4 : 80 pg d'insert ADNc double brin Chiffre 5 : 100 pg d'insert ADNc double brin

Chiffre 6 : 120 pg d'insert ADNc double brin Chiffre 7 : 140 pg d'insert ADNc double brin

Chiffre 8 : 160 pg d'insert ADNc double brin

C'est pourquoi, nous voudrions mettre en évidence, pour différentes souches du parasite, l'existence d'une variation de la quantité pour cette protéine via l'expression de son ARNm et en déduire ainsi une corrélation avec leur degré de virulence.

Pour valider cette hypothèse, nous devons être en mesure de quantifier l'ARNm de la protéine GRA2. La méthode traditionnelle serait d'utiliser la technique du "Northern blot". Cependant, cette technique présente un certain nombre d'inconvénients dont le plus important est le manque de sensibilité. Par contre, il est facile de pallier à ce problème en utilisant un système de PCR quantitative sur ARN (RT-PCR quantitative)

La sensibilité et la spécificité de la technique PCR permet la détection de séquences d'ADN très faiblement représentées (de l'ordre de la copie) dans un échantillon donné mais également d'ARN après un étape de "reverse transcription" (RT).

La quantification des molécules d'ARNm via l'utilisation de la PCR (RT-PCR) pouvait être obtenue par l'emploi de molécules standard. La PCR quantitative sur ARN est par conséquent peu différente de la PCR quantitative sur ADN, si ce n'est l'étape supplémentaire de la réverse transcription.

Au sein de notre laboratoire, nous nous sommes investis dans un projet d'étude concernant l'implication de l'expression des gènes de granules denses (dont *GRA2*) dans la virulence des souches de *Toxoplasma gondii*. Pour cela, nous nous sommes tout particulièrement attachés à la construction des outils indispensables à l'élaboration d'un modèle de RT-PCR quantitative en nous inspirant de celui décrit par Kourilsky (Pannetier *et al.*, 1993)

Dans ce modèle de PCR quantitative sur ADN, Kourilsky a démontré l'importance de l'identité en séquences nucléotidiques entre la molécule étalon et la molécule cible (ADN génomique ou ARNm) pour pouvoir quantifier des produits PCR au delà de la phase exponentielle.

En effet, une étude en phase de plateau permet d'une part d'éviter de recalibrer systématiquement les conditions d'amplification lors de l'utilisation d'une nouvelle gamme étalon, et d'autre part d'avoir à prédéterminer les concentrations d'ADN cible pour qu'elles soient comprises dans les limites de la gamme.

Les auteurs comparent deux molécules étalon de 163 pb, toutes deux utilisées pour quantifier un même gène murin d'histocompatibilité de classe I (K^d). La première était, en terme de séquence, quasi identique à la molécule cible mais possédait 4 paires de

bases supplémentaires obtenues par modification d'un site de restriction Hind III. La deuxième possédait, en terme de région commune avec la molécule cible, ces deux extrémités. Elles correspondaient aux séquences complémentaires des amorces utilisées dans la réaction d'amplification. Après coamplification de la molécule étalon et de la molécule cible, seule la première molécule étalon permettait une quantification des produits PCR pour des amplifications réalisées au delà de la phase exponentielle (phase plateau). Par contre, la deuxième ne le permettait pas car la molécule cible et la molécule étalon se comportaient comme deux espèces moléculaires indépendantes. Une deuxième série d'expériences montrait qu'une quantification indépendante du nombre de cycles (25, 30 et 40) pouvait s'effectuer uniquement lors de l'emploi de la première molécule étalon. Dans le cas de la deuxième, la quantification était possible lorsque le nombre de cycle était inférieur à 25. Il apparaissait primordial que la séquence de la molécule cible et de la molécule étalon possèdent quasiment la même séquence pour pouvoir quantifier des produits d'amplification obtenus après la phase de plateau. De plus, il se produit une dérive d'amplification entre les molécules cibles et étalon lorsque ces deux molécules possèdent une différence de taille supérieure à 10 pb (communication personnelle).

En travaillant au-delà de la phase exponentielle, nous augmentons la sensibilité et par conséquent, obtenons une meilleur détection pour des quantités faibles d'ARN messenger. Nous avons donc décidé de construire une molécule étalon quasi identique en terme de séquence à la molécule cible. Pour cela, nous avons sélectionné une stratégie qui consiste à modifier un site unique de restriction présent dans le gène de *GRA2* et absent dans le vecteur de clonage (figure 46). Le principe de PCR compétitive entre la molécule standard (plasmide ADN) et la molécule cible (ARNm) est détaillé dans la figure 47.

Après modification du site de restriction, quatre clones positifs issus de bactéries JM109 transformées par le plasmide recombinant modifié ont été analysés. Le séquençage manuel en simple brin a permis alors de vérifier que ces quatres clones avaient tous un site de restriction modifié. Le plasmide recombinant correspondant à la molécule standard pour le gène *GRA2* a été produit et purifié sur double gradient de CsCl.

Pour pouvoir séparer deux molécules quasi identiques en taille, nous avons utilisé le pouvoir de résolution des gels de séquence. La détection des produits PCR se fait à l'aide de molécules fluorescentes (séquenceur automatique). Pour cette raison, nous avons greffé une molécule de fluorescéine à l'extrémité de l'une des amorces. La figure 48 schématise le système de révélation des produits PCR dans un système

Figure 46 : Construction de la molécule standard *GRA2* par modification de site de restriction

Le clone L (Mercier, 1993) correspondant au clone le plus long de l'ARNm du gène *GRA2*, a été obtenu à partir d'une banque d'expression construite dans le vecteur λ ZapII. Après purification, le vecteur plasmidique recombinant (pBluescript II SK (-) insert clone L-*GRA2*) est digéré par l'enzyme de restriction BstE II comme décrit dans le matériel et méthodes. Cette enzyme a été choisie parce que ce site de restriction était unique dans la séquence du gène *GRA2* et absent dans celle du vecteur de clonage mais aussi parce qu'il génère des extrémités cohésives 3' sortantes. Des extrémités "bout franc" sont obtenues après addition de nucléotides par traitement au fragment de Klenow puis religuées entre elles. On obtient ainsi un vecteur recombinant dont la modification du site de restriction BstE II a permis un ajout de 5 pb (en caractère gras).

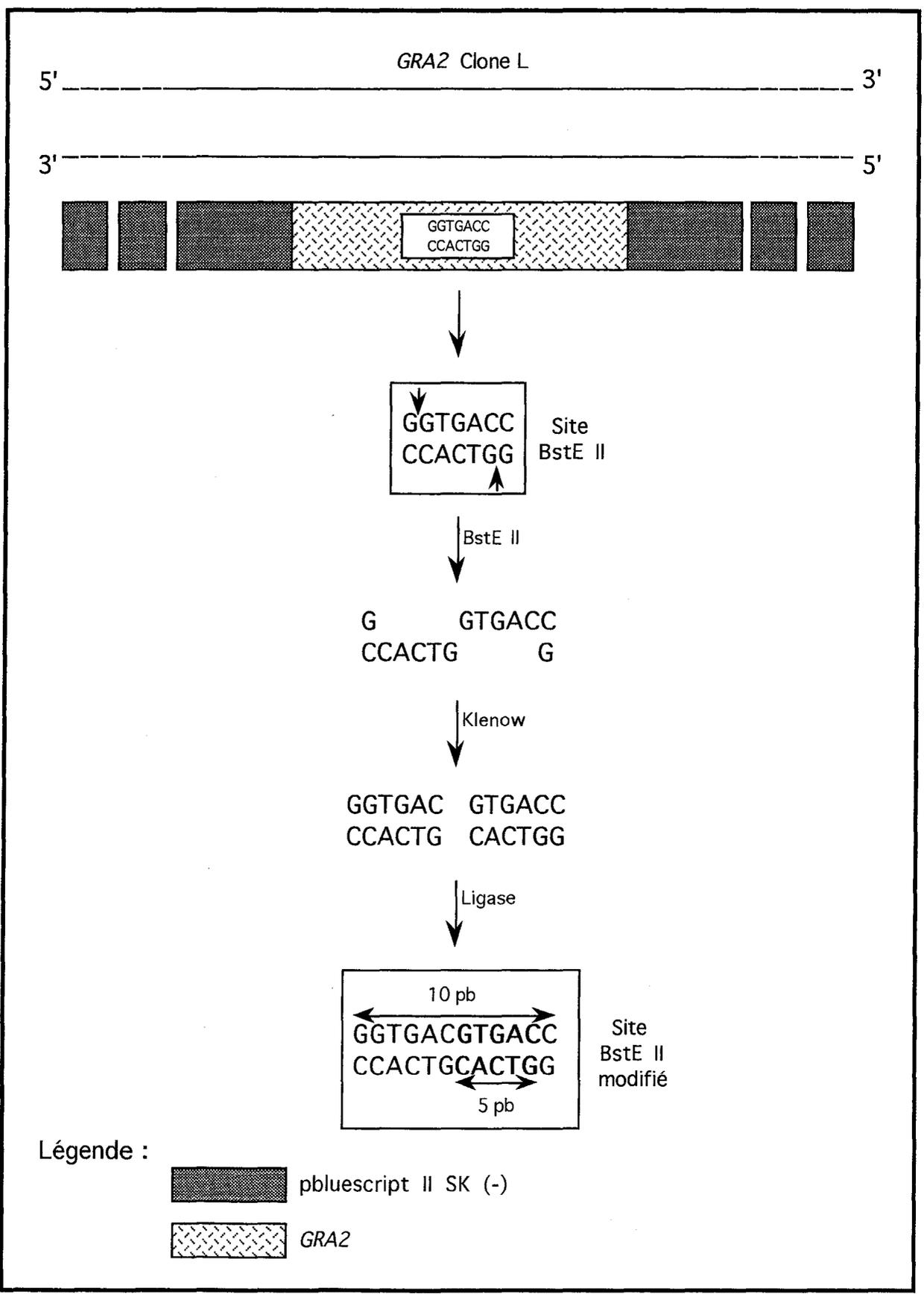


Figure 47 : Schéma théorique de la PCR quantitative sur ARN

La première étape consiste à transformer un ARN messager en ADN complémentaire par réverse transcription. Cet ADN simple brin sert alors de matrice pour l'amorce sens au cours de l'étape d'appariement du premier cycle d'amplification. En gras sont indiqués les fragments néosynthétisés pour un cycle donné. Il faut attendre le troisième cycle pour obtenir la première molécule d'ADN simple brin de taille attendue (délimitée par les deux amorces) et renfermant dans sa séquence l'amorce sens (indiqué par un astérisque "*" dans la figure). Dans le cas de la molécule standard, ce fragment apparaît dès le deuxième cycle d'amplification. Ces fragments dont la taille est définie par les deux amorces s'amplifient exponentiellement au cours des cycles successifs alors que les autres fragments suivent une augmentation linéaire (leurs quantités deviennent après plusieurs cycles, minoritaires vis à vis de l'ensemble des produits PCR).

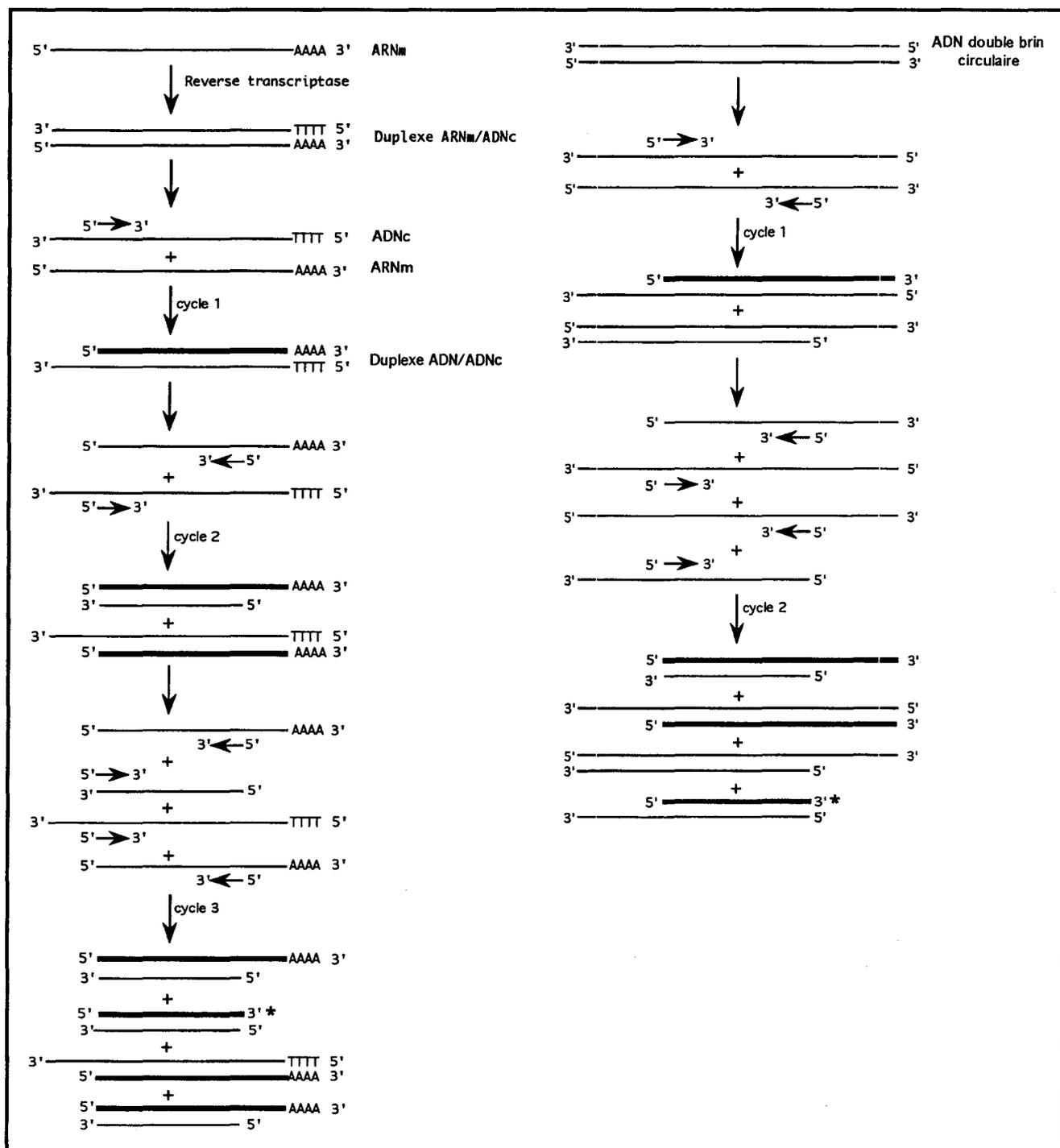
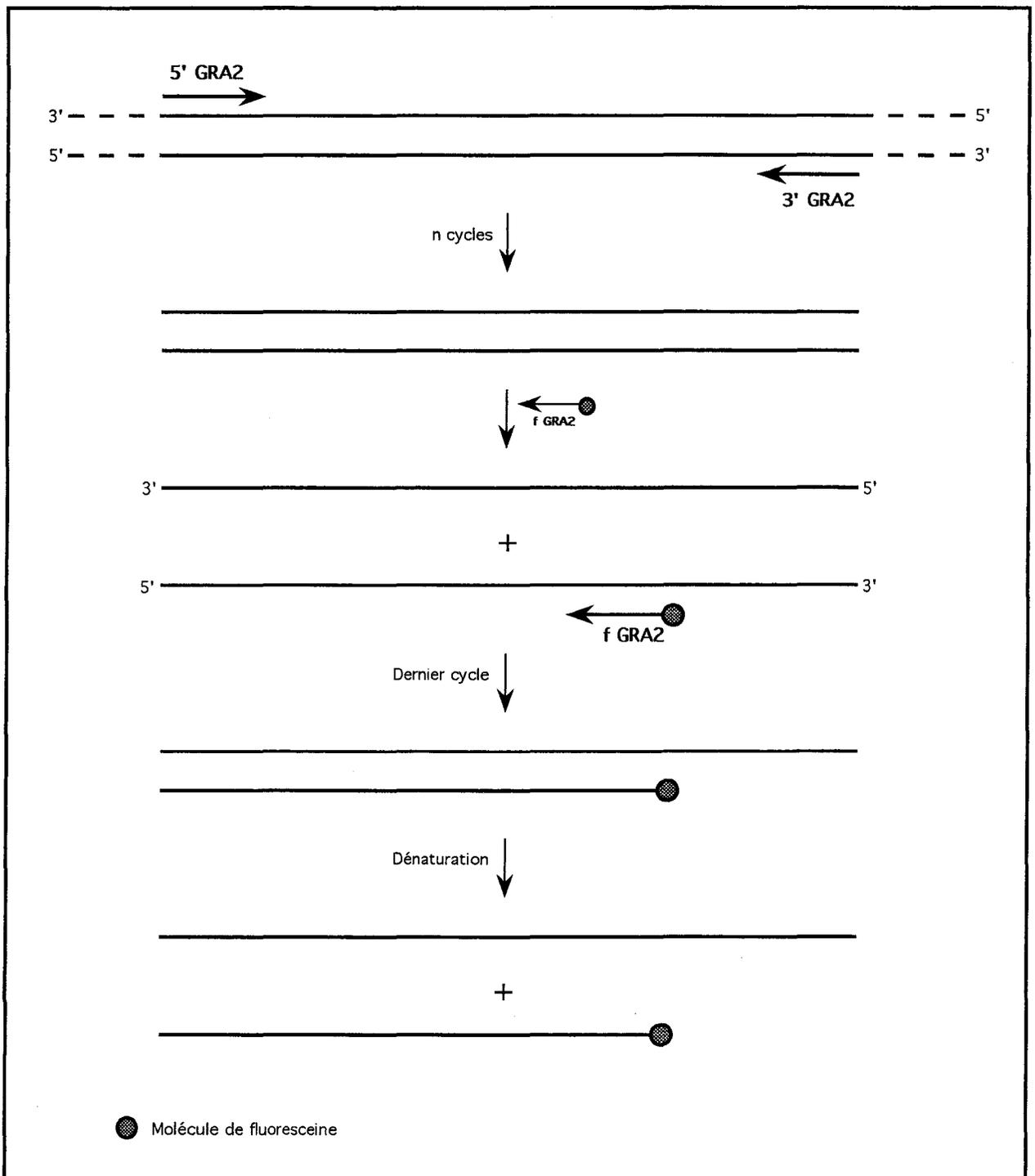


Figure 48 : Principe de révélation des produits PCR *GRA2* dans un système "run-off"

Le premier couple d'amorces (5' *GRA2* et 3' *GRA2*) s'apparie à la matrice cible et permet ainsi d'obtenir après *n* cycles d'amplification un produit PCR de taille connue et délimité par ces deux amorces. Au dernier cycle, l'amorce marquée à la fluorescéine et reconnaissant une région d'ADN comprise entre les deux amorces non marquées, est rajoutée au mélange réactionnel d'amplification. Cette étape génère un produit PCR constitué de deux brins de taille différente. Le plus court correspondant au brin marqué à la fluorescéine. Après dénaturation du produit final d'amplification, le brin marqué et libéré de sa matrice sera le seul fragment d'ADN simple brin détecté par le faisceau laser lors de la migration sur un gel de séquence.



"run-off". La figure 49 montre au niveau de la séquence génomique *GRA2* et du clone L (sans intron), la localisation de la sonde et des trois amorces utilisées dans ce système de PCR.

Les premières expériences réalisées à partir de ce gène *GRA2* ont permis de vérifier le comportement des amorces sélectionnées sur de l'ADN génomique mais également de contrôler la qualité de la préparation de l'ARN (figure 51 A).

Parallèlement, nous avons réalisé un modèle de PCR quantitative sur ARN à partir du gène β tubuline. En effet, pour un échantillon donné ce gène peut servir de gène rapporteur au même titre que celui du gène actine utilisé dans des modèles de PCR semi-quantitatives. Ceci n'est envisageable que dans la mesure où l'expression de ce gène est constante pour un stade donné quelque soit la souche étudiée. Nous avons sélectionné le gène β tubuline car la séquence du gène d'actine de *Toxoplasma gondii* n'avait pas encore été publiée. Les premiers résultats d'amplification sur ADN, ANt et ARN obtenus pour les amorces sélectionnées sont également montrés dans la figure 51 A et 51 B. La figure 50 montre la localisation de la sonde et des trois amorces dans le cas du gène β tubuline.

Dans le cas du gène *GRA2*, l'amplification d'ANt après RT/PCR (figure 51 A, piste 2), produit trois fragments dont deux étaient de taille attendue (563 pb pour le fragment d'ADN génomique avec intron et 322 pb pour l'ARNm dépourvu d'intron). Ces deux bandes reflètent la somme des produits attendus d'amplification résultant de l'ADN génomique et de l'ARNm. L'ARN seul après RT/PCR donne bien un fragment unique de 322 pb (figure 51 A, piste 1). L'ADN génomique après PCR génère un fragment attendu de 563 pb et un fragment inconnu de 483 pb.(figure 51 A, piste 3) Dans la mesure où l'ARN seul ne donnait qu'une seule bande et que l'ADN seul générerait deux bandes, l'hypothèse d'un ARN prémessager était écartée. Pour savoir s'il s'agissait alors d'une autre forme du gène *GRA2*, ce fragment a été cloné en "TA Cloning" et entièrement séquencé en simple brin. La comparaison de la séquence à une banque de données que ce soit en ADN ou en protéines, n'a révélé aucune homologie significative. Ce fragment de 483 pb correspond à un produit PCR aspécifique. Il faudra donc modifier les conditions d'amplification pour obtenir la disparition de cette bande.

Dans le cas du gène β tubuline, L'ADN (figure 51 A, piste 5) et l'ARN (figure 51 B, piste 2) donnent un seul fragment de taille attendue. Il n'apparaît pas de produit aspécifique. Les ANt (figure 51 A, piste 7) confirment le résultat de deux bandes attendues dans la mesure où ils reflètent la coexistence de l'ADN génomique et de l'ARN.



AAAAACAAGTTCGTCGAAAAGGTTAATTACCT

ACGCCACCGAAGGAAAAACGCGTATCACGTCAGTCCTTACGGTCAATATACAAATACTTGGGCCGTCCAAGTGGAG
 GCAACGTGCCCGTCGCACGGTGATACTGACTGGTGACTIONGACGTACGTCTCTCGCCGGCGTCCAAACCAAATTG
 ACCCGGGGACGCTACTCCCTGTCGTCCTTAGGCTAAGTGGAGCAACATCTCTACACAGAGACGACGCCAGAG
 ACGCAAAATGAACAGCGGAACCTGCGTCGCTGTCTGCTCCTGCGAACTGATGACAGAAAAGGGTCATTAACGATTT
 CTTTTGCAATTCG *CGTCGTTATCGCACGTTGTTCTCTTCCCACGAATAGTTGTTTTGATTAGATATTGCTTC
 TTCTCCACATATCGCCTCACAATGTTGCGCCGTAACAAATTGTTTGGTGGTTGTTGCCGTTGGCGCCTGGTCAAC
 GTCTCGGTGAGGGCTGCCGAGTTTTCCGGAGTTGTTAACAGGGACCAGTCGACGTGCCTTTCAGCGGTAAACCT

5'GRA2

5'CTTGATGAGAGAGCAGTTGG 3' (GTAAGTTGGCAAAGTAATGATAGAGGCAGGGGTTGAACGATAG
 GCGGCTGCAGATTTGTATAACACAACATGATGTAGCTGCCACGGTTTTTTTTCCGGAGAGTGATGCCGTCTGACTG
 TTCATCGACCCATGGGAGCTAGGGAGGTGCGCTTCTGTGTGATATGTATTGTCCTAGTCCAATTTCCCACGCA
 CTGTAGTGTCTTGAGACTCGGTGCCATGTAGAATTTGTGTCTGCAG) AGGAAAAGGTGAACATACACCAC
 CACTCCAGACGAGAGGCAACAAGAGCCAGAAGAACCGTTTTCCAA CGTGCATCCAGAGTGGCAGAACAACTG
S GRA2

TTTCGCAAGTTCTTGAAGTTCGCTGAAAACGTCGGACATCACAGTGAGAAGGCCTTCAAAAAAGCAAAGGTGGTG
 GCAGAAAAGGCTTCAACCGCGGCAAAAACGCACACGGTTAGGGGTTTCAAGGTGGCAAAGAAGCAGCTGGAAGG
 GGCAT GGTGACC GTT *GGCAAGAACTCGCGAATGT* G *GAGAGTGACAGAAGCACTAC*

BstE II 3' *CCGTTCTTTGAGCGCTTACA*-f 5'3' *CTCTCACTGTCTTCGTGATG* 5'
f GRA2 3' GRA2 GACAAC

GAGGCCCCCGACAGCCCTAATGGCCTGGCAGAAACCGAGGTTCCAGTGGAGCCCAACAGCGGGCCGCACACGTG
 CCCGTCCAGACTTTTCGAGTAATGTTGACTACGACGAAAGTGATGCGCAGGCTGAAAGCCGCTGAAGGGAGA
 AGTCTACAAAGCCGATCAGTAAAAATGTGTGGGAGGTGGTCTTGTGCGAAGTGAATGGTGTAAAGCATCG
 TGTTGCAATGCAGTGCCTGTATCAGTTGTGCGCGGAAGGACACTGCTTCAATGTTAAGAACCTGTTTTCTCCGTA
 GAGAGGACCAAAAGACGATTGCAAACTGGTATGTACGCAATAGCCCAATGCCGGACGTCAGTTGGTTGTATGTG
 ACGTCCCAGATGTCATATGCCTTGTGAGTGTCTGGGATGCAAGTTTTTGGTGTGCGTTGATTTCGCCAGCTT
 ATGACAGTGGCAGACGAATTATTGACATGATACAAGGACGC* AGAAAGGAACAAACACCGTAGTTCAGTCGAC

Figure 49 : Gène *GRA2* Position des amorces et de la sonde

Ici est représentée la séquence génomique du gène *GRA2*. La séquence comprise entre les deux astérisques correspond à la séquence du clone L du gène *GRA2*. L'intron absent dans le clone L, est délimité par les deux parenthèses. La séquence des deux amorces non marquées est représentée en caractère "relief" (5' *GRA2* et 3' *GRA2*). L'amorce marquée à la fluorescéine (f *GRA2*) est en caractère "italique". La sonde (S *GRA2*) et le site de restriction *BstE II* sont soulignés.



Figure 50 : Gène β tubuline. Position des amorces et de la sonde

Seules les 1030 premières bases de la séquence du gène β tubuline (Nagel et Boothroyd, 1988) sont représentées. La séquence comprise entre les deux parenthèses correspond au premier intron. La séquence délimitée par les deux astérisques et dépourvue de l'intron correspond à la séquence du produit PCR qui a été cloné dans le vecteur "TA Cloning". Les deux amorces non marquées (5' β tub et 3' β tub) sont représentées en caractère "relief". L'amorce marquée à la fluoresceine (f β tub) est en caractère "italique". La sonde (S β tub) et le site de restriction Age I sont soulignés.

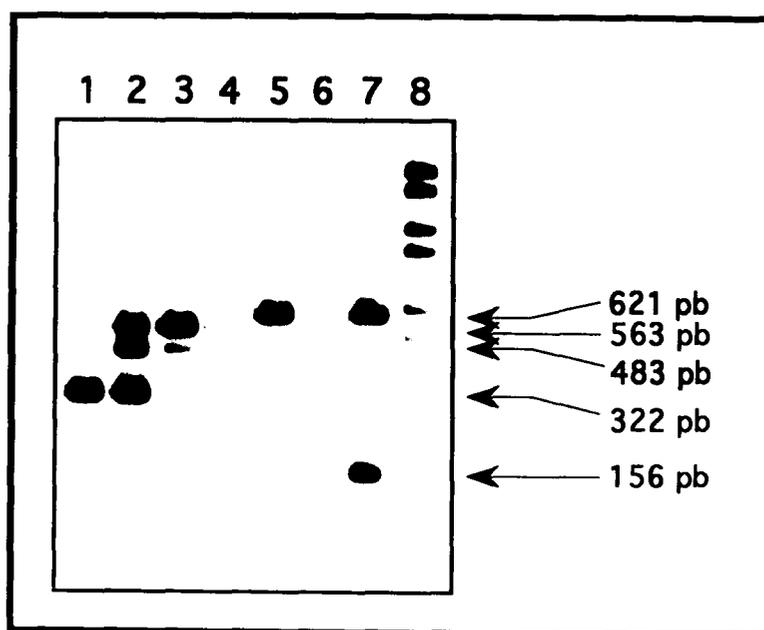


Figure 51 A : Amplification d'ADN génomique, d'ARNm et d'ANt pour les gènes *GRA2* et β tubuline

L'ADN génomique a été préparé sur double gradient de CsCl à partir de tachyzoïtes (souche RH). La préparation d'ANt de tachyzoïtes est décrite dans le matériel et méthodes. L'ARN est obtenu après traitement des ANt à la DNase I. Les conditions d'amplification sont les suivantes: une prédénaturation de 5 mn 15 s à 94°C, une dénaturation de 45 s à 94°C, un appariement de 30 s à 55°C, une élongation de 1 mn à 72°C et après les 35 cycles une élongation finale de 7 mn à 72°C. Les étapes de RT/PCR sont détaillées dans le matériel et méthodes. Les produits PCR sont ensuite séparés sur gel d'agarose 2% en TBE 1x sous ampérage constant de 35 mA. Les fragments sont ensuite révélés après coloration du gel dans une solution de BET.

Piste 1 : RT/PCR, ANt + DNase I, couple d'amorces 5'GRA2 et 3' GRA2

Piste 2: RT/PCR, ANt, couple d'amorces 5'GRA2 et 3' GRA2

Piste 3 : PCR, ADN génomique, couple d'amorces 5'GRA2 et 3' GRA2

Piste 4 : RT/PCR, témoin négatif eau, couple d'amorces 5'GRA2 et 3' GRA2

Piste 5: PCR, ADN génomique, couple d'amorces 5' β tub et 3' β tub

Piste 6 : RT/PCR, témoin négatif eau, couple d'amorces 5' β tub et 3' β tub

Piste 7: RT/PCR, ANt, couple d'amorces 5' β tub et 3' β tub

Piste 8: Poids moléculaire VI (Boehringer mannheim)

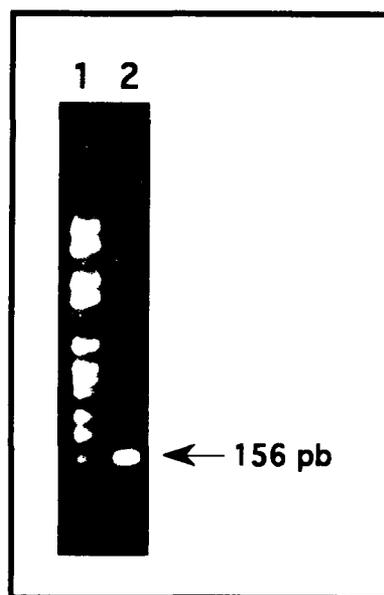


Figure 51 B : Amplification d'ARNm pour le gène β tubuline

Piste 1 : Poids moléculaire VI (Boehringer mannheim)

Piste 2 : RT/PCR, ANt + DNase I, couple d'amorces 5' β tub et 3' β tub

Les témoins négatifs (figure 51 A, piste 4 et 6) montrent l'absence de contamination des mélanges réactionnels.

L'intérêt de prendre un couple d'amorces encadrant un intron permet, dans un modèle de RT/PCR, de vérifier l'efficacité de la digestion à la DNase I et l'absence de contamination de la préparation d'ARN par de l'ADN génomique, dans la mesure où les produits issus de l'ADN et de l'ARN sont physiquement séparables sur un gel d'agarose.

Ne disposant pas de vecteur "gène β tubuline" pour construire la molécule standard (même méthodologie que pour le gène *GRA2*), nous avons cloné dans le vecteur "TA Cloning" une région du gène β tubuline à partir du fragment PCR (156 pb) issu de l'ARNm (figure 51 B, piste 2). Après vérification de la présence de l'insert, quatre des six transformants positifs (souche bactérienne XL-1 Blue, système de sélection Xgal-Ampicilline) ont été analysés par séquençage manuel en simple brin. Chacun d'eux présentait un insert qui était délimité par les deux amorces 5' β tub et 3' β tub et dont la séquence était identique pour la région concernée au gène β tubuline dépourvu de l'intron. L'insert était correctement cloné à la base près dans le vecteur. Ensuite seul le clone n°2 (non illustré) a été sélectionné pour poursuivre la construction de la molécule standard. Après préparation du plasmide recombinant et modification du site de restriction Age I, deux clones positifs (Souche bactérienne XL-1 Blue, sélection sur milieu LB-Ampicilline) ont été analysés (non illustré). Le séquençage manuel en simple brin a confirmé la présence d'un site de restriction correctement modifié. La séquence ACCGGT a été remplacée par la séquence ACCGGCCGGT, ce qui correspond à un ajout de 4 pb. Ces clones ont été conservés sous forme glycérolée et pour l'un d'entre eux le plasmide recombinant équivalent au standard pour le gène β tubuline a été produit et purifié sur double gradient de CsCl.

Nous disposons grâce à ces différentes constructions (oligonucléotides spécifiques du gène *GRA2* et molécule étalon) de tous les outils nécessaires pour mettre en place un modèle de PCR quantitative sur ARNm pour le gène *GRA2*.

DISCUSSION

Avant l'apparition du SIDA, la toxoplasmose était essentiellement redoutée dans le cas de toxoplasmose congénitale. La survenue fréquente de toxoplasmoses gravissimes chez les malades immunodéprimés a radicalement changé la conception de cette maladie parasitaire. Rappelons qu'en 1990 aux Etats-Unis, la toxoplasmose cérébrale chez les sidéens était responsable d'environ 30% des décès (Cristina-Curt *et al.*, 1990). En France, les perspectives sont proportionnellement plus sombres puisque la prévalence des toxoplasmoses latentes y est plus élevée qu'aux Etats-unis et que 50% environ des adultes jeunes de notre pays présentent une sérologie toxoplasmique positive (Ambroise-Thomas et Cristina, 1991). Or, précisément, c'est au réveil de toxoplasmoses latentes que correspondent le plus souvent les formes cérébrales observées chez les sidéens.

Le sérodiagnostic permet la surveillance des séroconversions chez les mères non immunes susceptibles de transmettre l'infection au fœtus. Cependant, la réponse immunitaire globale du fœtus est souvent trop faible pour permettre l'estimation de son immunité toxoplasmique. Chez les immunodéprimés, les résultats sérologiques (sérums et liquide céphalo-rachidien) restent souvent ininterprétables (la production d'anticorps pouvant être totalement inhibée voire sans rapport avec le stimulus antigénique) (Wank *et al.*, 1987). Quant au diagnostic direct par inoculation de prélèvement à la souris ou à des cultures cellulaires, il a l'inconvénient majeur d'être beaucoup trop long. Parfois, chez les sujets immunodéprimés, la mort par lésions cérébrales peut survenir avant même la réponse des examens parasitologiques.

C'est pourquoi, les insuffisances du sérodiagnostic et du diagnostic parasitologique sont peu compatibles avec le dépistage précoce d'une toxoplasmose cérébrale ou congénitale. Dans cette perspective, le diagnostic direct des formes libres du parasite par amplification dans le liquide amniotique, le sang, le liquide céphalo-rachidien ou les lavages broncho-alvéolaires (toxoplasmose pulmonaire), constitue une alternative intéressante.

Pour répondre à ce besoin, nous avons mis en place dans notre laboratoire un test de diagnostic par PCR comparable à celui développé par Burg qui permettait déjà de détecter spécifiquement au moins 10 parasites (Burg *et al.*, 1989).

DIAGNOSTIC DE LA TOXOPLASMOSE PAR AMPLIFICATION GENIQUE

Elaboration d'un test diagnostique de toxoplasmose par PCR

Lors de son élaboration, nous avons favorisé la sensibilité et la spécificité parasitaire sans pour autant renoncer à l'intérêt d'un délai rapide pour l'obtention du

résultat final. Comme nous voulions être en mesure de diagnostiquer différentes formes de toxoplasmose (toxoplasmose congénitale chez le fœtus ou le nouveau né et toxoplasmose encéphalique ou pulmonaire chez les sujets sidéens), nous avons élaboré notre test sur des échantillons expérimentaux comparables aux prélèvements biologiques d'intérêts (liquide amniotique, liquide céphalorachidien et lavages broncho-alvéolaires). Nous avons donc reconstitué des échantillons de parasites dilués dans un excès de cellules humaines.

Le premier diagnostic par PCR décrit dans la littérature et appliqué à un modèle de toxoplasmose congénitale utilisait, comme source d'ADN, des lysats bruts issus de liquide amniotique puis conservés par congélation avant analyse (Grover *et al.*, 1990). Cette préparation d'ADN génomique total avait l'avantage d'être rapide mais présentait l'inconvénient de fournir une matrice d'amplification chargée de nombreux débris cellulaires. Or, ces derniers sont directement impliqués dans l'inhibition de l'activité enzymatique de la Taq polymérase, d'où une répercussion sur le seuil de sensibilité. Pour cette raison, nous avons préféré purifier l'ADN génomique total, en éliminant de cette préparation les constituants protéiques, lipidiques et les ARN. Bien que cette étape supplémentaire rallonge la durée globale du test diagnostique, elle améliore, en contre partie, sa sensibilité. Pourtant, il est intéressant pour un même prélèvement biologique, de combiner ces deux voies de préparation de matrice (lysate brut et matrice purifiée). La première, à partir du lysate brut permettrait d'effectuer un tri rapide des personnes à risque. Quant à la seconde, elle permettrait de confirmer les résultats obtenus lors de la première analyse mais également de révéler d'éventuels faux négatifs.

Cet intérêt de dépister le plus rapidement possible des sujets potentiellement à risque a également été présenté dans une étude sérologique de la toxoplasmose congénitale humaine (Fricker-Hildalgo *et al.*, 1996). Les auteurs ont montré que l'ELIFA était beaucoup moins spécifique comparée à l'IFI et l'ELISA, mais que, conjointement à l'ISAGA, elle a contribué dès la naissance, par sa plus grande sensibilité, à l'orientation vers un diagnostic de toxoplasmose congénitale et à mettre en place un traitement adapté très précoce.

Pour améliorer la sensibilité du diagnostic par amplification génique, l'utilisation d'un gène hautement répété représentait un atout considérable. Bien que notre stratégie visant à cloner le gène histone H4 de *Toxoplasma gondii* n'ait pas abouti, cette dernière s'est avérée concluante pour une autre espèce parasitaire *Plasmodium falciparum*. Comme cette stratégie reposait sur l'utilisation d'amorce consensus, l'absence de résultat positif pour le toxoplasme pourrait s'expliquer par une homologie insuffisante entre les amorces consensus et le gène histone H4. L'incorporation au niveau de l'extrémité de

chacune des deux amorces, d'un site de restriction EcoR1 (dans le but de favoriser secondairement le clonage du produit d'amplification d'intérêt), s'est accompagnée d'une augmentation de leur pourcentage en AT. Or, la richesse en AT du génome de *Plasmodium falciparum* (82% ; Weber, 1987), en comparaison à celui de *Toxoplasma gondii* (50% environ), permettrait d'expliquer pourquoi ces amorces consensus se sont hybridées plus favorablement à la cible génomique de *Plasmodium*. Pour la poursuite de notre étude, nous avons conservé le gène B1 comme gène répété. En effet, à partir des mêmes conditions d'amplification décrites pour le couple de référence (Burg *et al.*, 1989), nous sommes parvenus à sélectionner un autre couple d'amorces qui offrait un meilleur rendement de production pour l'amplimère attendu. Grâce à ce gène, nous sommes parvenus à détecter un seul parasite à partir de nos échantillons expérimentaux.

Actuellement, la recherche d'un nouveau gène répété dans la mise en place d'un diagnostic de la toxoplasmose par PCR n'est plus aussi cruciale. En effet, il a été montré que, même avec un gène unique, il est possible d'obtenir expérimentalement un seuil de sensibilité équivalent à un parasite (Dupouy-Camet *et al.*, 1990). Par contre, sur l'ensemble des études publiées, concernant par exemple le diagnostic de la toxoplasmose congénitale par PCR réalisé à partir de liquide amniotique, l'utilisation d'un gène répété semble associé à la détection d'un plus grand nombre de sujets (Dupouy-Camet *et al.*, 1992 ; Grover *et al.*, 1990 ; Hohlfeld *et al.*, 1994 et Cazenave *et al.*, 1992). Ces différentes équipes obtiennent respectivement une sensibilité de 70% (7/10, gène *SAG1*), 80% (8/10, gène B1), 97% (37/38, gène B1) et 100% (10/10, gène ARNr 18S).

Cependant, ces pourcentages à l'exception de ceux de Hohlfeld (38 patients), devraient être confirmés sur des effectifs plus importants. Hohlfeld et ses collaborateurs (Hohlfeld *et al.*, 1994) ont apporté un système de contrôle de l'amplification par addition d'une molécule d'ADN amplifiée grâce au même couple d'amorces que celui utilisé pour mettre en évidence le gène B1 de *Toxoplasma gondii*. Ce système a l'avantage d'écartier les résultats faussement positifs et par conséquent justifie leurs très bons résultats (97%).

Pourtant, même l'utilisation d'un gène fortement répété (100 copies) ne permet pas à partir d'échantillons sanguins d'obtenir un seuil de sensibilité d'un parasite (un seuil de sensibilité de 5 parasites a été obtenu dans l'étude de Cazenave) (Cazenave *et al.*, 1990). Or, les prélèvements sanguins sont très intéressants à exploiter dans le cas de toxoplasmose congénitale (sang du cordon). Pour de tels prélèvements où les inhibiteurs de la polymérase sont importants (hème), l'amplification d'un gène hautement répété pourrait permettre de diminuer le seuil de sensibilité à un parasite. Rappelons également, que des séquences spécifiques du parasite correspondant à 1000 copies (Blanco *et al.*, 1992) ont été décrites, et pourtant, à ce jour, elles n'ont pas encore été testées dans un diagnostic par PCR.

La conservation de l'intégrité du génome parasitaire, tout au long des étapes de prélèvement et de préparation des matrices génomiques précédant l'étape d'amplification, est également à reconsidérer pour l'amélioration de la sensibilité du diagnostic par PCR. Nous avons cherché à optimiser le rendement de purification de l'ADN génomique par l'addition de molécules de glycogène lors de sa précipitation à l'éthanol. Il est également impératif de traiter le plus rapidement possible les prélèvements et de les conserver à une température suffisamment basse afin de ralentir la lyse parasitaire et l'action des ADNases.

En vue de réduire le temps d'analyse, nous avons supprimé l'étape d'hybridation des produits d'amplification par l'utilisation d'une sonde interne spécifique. Les produits d'amplification d'intérêt étaient révélés indirectement grâce aux molécules de biotine greffées sur les amorces elles-mêmes. Les produits spécifiques étaient alors identifiés en fonction de leur taille. Cette technique de reconnaissance est comparable au test développé par Cazenave (Cazenave *et al.*, 1990). Cependant, dans son modèle, les produits PCR spécifiques du parasite étaient révélés et identifiés après leur digestion par un enzyme de restriction et après coloration du gel au BET.

Par contre, pour éviter l'apparition de produits aspécifiques qui, par compétition, influent sur le rendement de l'amplification, nous avons optimisé les conditions expérimentales d'amplification. L'existence de ces produits dans un modèle de détection par PCR a été décrite pour le toxoplasme par Savva (Savva *et al.*, 1990). Après séparation des produits PCR sur gel d'agarose et après coloration au BET, l'auteur observait non pas une bande unique mais une trainée. La bande spécifique était secondairement identifiée après hybridation à l'aide d'une sonde radioactive.

Nous avons ainsi amélioré la spécificité et la sensibilité du test en éliminant complètement la formation des produits PCR aspécifiques précédant les premiers cycles d'amplification. Pour cela, la matrice était dénaturée puis maintenue dans la glace (10 mn à 94°C) avant d'être incorporée au mélange réactionnel (lui-même maintenu à 0°C). L'enzyme, quant à lui, était incorporé à ce mélange juste avant le déclenchement de l'étape de prédénaturation. Nous prenions également la précaution d'amener le bloc chauffant de l'automate à la température de prédénaturation de telle sorte que les tubes PCR passaient instantanément d'une température de 0° à 94°C. Il est également possible de neutraliser provisoirement l'activité de l'enzyme par incorporation d'un anticorps anti-Taq polymérase. Cet anticorps est ensuite dénaturé à une température supérieure à 70°C. (Kellogg *et al.*, 1994, Clontech, IX : 1-5), c'est à dire lors de l'étape de prédénaturation. Ces différentes précautions nous ont permis ainsi d'éviter la formation précoce de produits d'amplification aspécifiques.

La phase de mise au point terminée, nous devons poursuivre notre étude sur des prélèvements biologiques adéquats et en vérifier la fiabilité en le confrontant aux modèles conventionnels de diagnostic (sérologie et parasitologie). Comme nous disposons dans notre laboratoire d'un modèle de toxoplasmose congénitale chez le rat, il nous était possible de poursuivre notre étude par l'analyse de liquides amniotiques et de déterminer un taux de détection, puis par la suite, d'effectuer des tests à partir de prélèvements biologiques humains réalisés en cas de toxoplasmoses congénitales et de toxoplasmoses associées aux sidéens.

L'analyse d'une première série de liquides amniotiques issus de foetus "nude", nous a apporté d'autres résultats que ceux escomptés. En effet, nous nous attendions, dans la mesure où les rates gestantes étaient dépourvues d'un système immunitaire efficace, à observer un taux plus élevé de foetus contaminés corrélé à un nombre important de liquides amniotiques positifs. Cependant la majeure partie des foetus et des liquides amniotiques ont été testés négatifs (30/33) et les 3 liquides amniotiques positifs en PCR étaient associés à des foetus a priori non contaminés. Nous formulons, alors, l'hypothèse que le placenta pourrait pu jouer le rôle de barrière physique vis-à-vis de l'infection foetale. En admettant un tel rôle, il est alors tout à fait envisageable que les trois liquides amniotiques déterminés comme positifs puissent correspondre à une infection très tardive. Le résultat négatif obtenu par l'analyse foetale correspondrait soit à une réelle non-contamination parasitaire du foetus, soit à la détection par PCR de parasites morts. Dans la mesure où les foetus étaient sacrifiés, il nous était impossible de suivre l'évolution d'une transmission éventuelle.

Avantages du diagnostic de toxoplasmose par PCR

*** Comparaison entre PCR et techniques parasitologiques traditionnelles**

Le bénéfice diagnostique apporté par l'amplification génique dans la mise en évidence directe du parasite est indéniable. Comparé aux techniques parasitologiques classiques (culture cellulaire et inoculation à la souris), le diagnostic par PCR dans les modèles de toxoplasmoses humaines présente une meilleure sensibilité. Selon les auteurs, la sensibilité de la culture cellulaire varie de 40% (4/10) (Gover *et al.*, 1990) à 80% (8/10) (Dupouy-Camet *et al.*, 1992) en passant par des valeurs intermédiaires de 44% (4/9) (Derouin *et al.*, 1988) ; 60% (6/10) (Berrebi *et al.*, 1989) et 75% (3/4) (Foudrinier *et al.*, 1993) soit une moyenne de 58% (25/43). Quant à celle de l'inoculation

à la souris, elle est comprise entre 33% (4/12 et 1/3) (Berrebi *et al.*, 1989 et Foudrinier *et al.*, 1993) et 78% (7/9) (Derouin *et al.*, 1988) avec une moyenne estimée à 59% (26/44). Cette moyenne tient également compte des résultats de Grover et Dupouy-Camet (70% ; 7/10 et 7/10) (Grover *et al.*, 1990 ; Dupouy-Camet *et al.*, 1992).

De plus, le résultat de la PCR peut être obtenu en moins de 48 heures alors que le délai de réponse pour les techniques parasitologiques est supérieur à la semaine.

Dans un modèle expérimental *in vitro* correspondant à une gamme de tachyzoïtes (souche virulente 002) resuspendus et maintenus en vie dans un milieu minimum MEM (Eabge's minimal essential medium), les auteurs ont comparé les sensibilités de la PCR (gène unique *SAG1*), de la culture cellulaire et de l'inoculation à la souris en modifiant les conditions de prétraitement des parasites (James *et al.*, 1996). A l'exception de la culture cellulaire, la sensibilité était équivalente de 10 parasites pour des parasites conservés à 4°C pendant 24 ou 48 heures. Cependant, la culture cellulaire avait une sensibilité plus faible de 100 à 1000 parasites avec un délai de 10 jours pour le résultat, et l'inoculation à la souris nécessitait un délai de 6 semaines. Pour les parasites congelés (48 h à -20°C), la technique PCR était la plus sensible (100 parasites). De plus, elle seule était capable de détecter des parasites préalablement traités à la chaleur (10 mn à 70°C) mais avec une sensibilité plus faible (1000 toxoplasme). Les auteurs ont montré les avantages de l'utilisation de la PCR lors de l'analyse de prélèvements biologiques soumis à des conditions de transport défavorables afin d'éviter le problème de faux-négatifs. Ils montrent également que la PCR restait performante aussi bien pour des parasites extracellulaires qu' intracellulaires, vivants ou morts. Les auteurs proposent d'utiliser l'inoculation à la souris uniquement pour les prélèvements délivrés en moins d'une heure à température ambiante ou ceux conservés à 4°C avec des délais inférieurs à 24 heures. Enfin, ils suggèrent d'utiliser la PCR dans le diagnostic de toxoplasmose nécessitant un résultat urgent (toxoplasmose congénitale et chez les sidéens) ou dans le cas de toxoplasmoses associées à des tests sérologiques non concluants.

*** Toxoplasmose et immunodépression**

La PCR est également un atout précieux dans la détection de toxoplasmose encéphalique chez les sidéens en comparaison aux techniques sérologiques traditionnelles. Une évaluation effectuée à partir de 16 patients HIV présentant une toxoplasmose encéphalique positive (Rodriguez *et al.*, 1997) montre, après l'analyse du liquide céphalorachidien une sensibilité de détection par PCR de 62% (ou 50% selon la technique de préparation de l'ADN utilisée) comparée à une sensibilité de 0%, 18%, 12% et 6% respectivement liée à la détection d'IgM, d'IgA, d'antigènes circulants sériques et

d'antigènes circulants présents dans le liquide céphalorachidien. Les résultats sérologiques de cette étude sont similaires à ceux d'autres auteurs, c'est à dire présence d'IgA (moyenne de 12%) (Rodriguez *et al.*, 1997) et quasi absence d'IgM. Par contre, la détection des IgG avec une spécificité vis-à-vis du parasite de 48,8% était positive chez 100% des patients testés (16/16). C'est pourquoi, la présence d'IgG peut servir dans l'orientation d'un diagnostic prédictif d'une toxoplasmose encéphalique chez les sujets sidéens. Cependant, parmi les patients HIV-toxoplasmose encéphalique-positifs ayant reçu un traitement anti-toxoplasmique (5/16), la PCR ne permet d'obtenir que 20% (1/5) de sensibilité. Par contre, l'analyse des patients n'ayant pas reçu de drogues anti-toxoplasmiques donne 81% de détection (9/11). Ces observations démontrent que les traitements anti-toxoplasmiques sont à l'origine de résultats faux-négatifs lors d'une détermination de la présence directe du parasite par amplification génique. Les auteurs soulignent également une diminution de la sensibilité de la PCR (50% au lieu de 62%) lorsque la préparation de l'ADN génomique total issu des liquides céphalorachidiens comporte des étapes supplémentaires d'extraction phénol-chloroforme et de précipitation à l'isopropanol. Cette observation renforce notre point de vue sur la nécessité d'optimiser aussi bien les conditions d'amplification que les rendements de purification (comme l'addition de glycogène comme molécule entraîneur lors de l'étape de précipitation).

Deux modèles de nested PCR (gène B1) (Novati *et al.*, 1994 et Cingolani *et al.*, 1996) ont montré des résultats similaires. Dans le premier (Novati *et al.*, 1994), l'analyse de 19 liquides céphalorachidiens chez des patients sidéens a permis de confirmer 42,1% de toxoplasmose encéphaliques (8/19). C'est pourquoi, ces auteurs considèrent ce système de détection parasitaire comme relativement efficace chez des patients sidéens présentant une pathologie du système nerveux central.

Dans le second (Cingolani *et al.*, 1996), la sensibilité de détection était de 33% (6 liquides céphalorachidiens positifs sur 18 analysés). Cependant, la présence d'inhibiteurs de la Taq polymérase a été détectée dans 1 des 12 liquides céphalorachidiens négatifs. Ce faux-négatif permet de réajuster la sensibilité à 38% (7/18). Les auteurs ne relèvent aucune interférence entre la détection du parasite par PCR et la prophylaxie anti-toxoplasmique.

En utilisant l'amplification génique (gène B1 et séquence TGR1_E), la sensibilité de détection d'une toxoplasmose cérébrale chez des sujets atteints de SIDA, apparaît beaucoup plus faible avec des échantillons sanguins, comparés aux liquides céphalorachidiens. Ainsi, certains auteurs ont reporté à partir du sang une sensibilité de 25% (5/20) (Franzen *et al.*, 1997) qui chute à 0% après 7 à 10 jours de traitement anti-toxoplasmique. A partir des mêmes cibles génomiques, des résultats comparables

ont été décrits par Pelloux (Pelloux *et al.*, 1997). Dans son étude, réalisée chez des patients sidéens atteints également de toxoplasmose cérébrale, le pourcentage de détection par PCR sur des prélèvements sanguins varie de 24,3 (25/103) à 29,5% (31/105) en passant par 26,2% (27/103) selon la cible génomique sélectionnée (gène B1 ou séquence TGR1E) et la méthode d'amplification utilisée

La PCR a également été utilisée dans l'évaluation de la parasitémie par détection du gène B1, sur des prélèvements sanguins réalisés provenant de deux groupes de patients immunodéprimés suspectés d'avoir soit une toxoplasmose cérébrale (groupe 1) soit une toxoplasmose extracérébrale (groupe 2) (El Sayed Khalifa *et al.*, 1994). Les 2 patients appartenant au groupe 1 étaient HIV-positifs (toxoplasmose cérébrale positive). Le groupe 2 correspondait à des sujets immunodéprimés (HIV, transplantation d'organe, traitement à la cortisone, ...). Parmi les 9 patients de ce groupe, 5 étaient HIV+. Dans ce groupe 2, la parasitémie était détectée par PCR dans 55,5% des cas (5/9). Parmi les 7 patients sidéens (2/groupe 1 et 5/groupe 2), 85,7% des parasitémies étaient retrouvées par PCR (6/7). Par contre, parmi les n'ayant pas reçu de traitement anti-toxoplasmique (9 = 2/groupe 1 + 7/groupe 2), les auteurs détectent par PCR 77,8% des parasitémies (7/9). Les auteurs en ont conclu que l'analyse du sang par PCR peut être appréciable dans les cas de toxoplasmose extracérébrale car la maladie s'accompagne, via le tissu sanguin, d'une dissémination du parasite dans l'organisme.

*** Toxoplasmose oculaire**

Chez des patients HIV-positif, l'analyse de l'humeur aqueuse par PCR a permis de confirmer une rétinite toxoplasmique dans 20% des cas (Verbraak *et al.*, 1996). Par contre, le coefficient de Goldmann-Witmer (total IgG humeur aqueuse / total IgG sérique) s'est avéré positif dans 60% de cas). Cependant, en raison du faible échantillonnage analysé, il n'est pas permis de conclure à une meilleure efficacité de la PCR vis-à-vis des techniques sérologiques, dans l'identification de l'origine des rétinites toxoplasmiques des immunodéprimés.

La toxoplasmose oculaire est la cause la plus fréquente d'inflammation chorioretinienne chez les sujets immunocompétents. Correspondant souvent à une forme évolutive de la toxoplasmose congénitale, elle peut se manifester sur une rétine antérieure avec un risque accru en période de puberté et pendant l'adolescence (Bloch-Michel *et al.*, 1992). Le diagnostic biologique de toxoplasmose oculaire repose essentiellement sur les tests sérologiques et la ponction de la chambre antérieure, à la recherche d'une production locale d'anticorps spécifiques. Actuellement, l'amplification

génique propose une alternative dans la détection directe du parasite (humeur aqueuse). La sensibilité de détection est similaire selon les auteurs (30%, 7/23, Aouizerate *et al.*, 1991 ; 38%, 25/65, Cazenave *et al.*, 1992). Dans cette dernière étude (Cazenave *et al.*, 1992), le rapport des charges immunitaires (coefficient de Desmont = C ; Brézin, 1991) a permis de diagnostiquer 42% des cas (27/65). Par contre, en combinant les méthodes PCR (38%) et sérologique (42%), les auteurs ont augmenté leur score à 58% (38/65). Cette observation démontre l'intérêt de coupler la recherche parasitologique directe au calcul de la charge immunitaire mais également, selon d'autres auteurs, à la détection locale d'isotypes IgM, IgA et IgE (Marx-Chela *et al.*, 1993).

*** Toxoplasmose congénitale**

Le diagnostic de toxoplasmose congénitale est généralement réalisé *in utéro*, à partir de signes échographiques évocateurs, de détections spécifiques sérologiques (IgM et IgA, ...) dans le sang de cordon et de la mise en évidence directe du parasite dans le sang du cordon et le liquide amniotique (PCR et autres techniques parasitologiques). L'existence de certains signes indirects recherchés sur le sang de cordon constitue un argument complémentaire en faveur de l'atteinte congénitale. Toutefois, l'interprétation des résultats biologiques nécessite une certaine prudence en raison du risque possible de contamination des prélèvements biologiques (sang du cordon et liquide amniotique) par le sang maternel.

Le diagnostic de la toxoplasmose anténatal constitue une information capitale pour la mise en place rapide d'un traitement, car cette maladie peut être mortelle pour le fœtus. Van de Ven confirma l'origine toxoplasmique d'une mort foetale (survenue après 17 semaines de grossesse) par PCR et inoculation à la souris (Van de Ven *et al.*, 1991). Actuellement, l'amniocentèse est autorisée dès la 13^{ième} semaine d'aménorrhée (au lieu de la 16^{ième}) rendant possible un dépistage très précoce et cela sans risque supplémentaire de complication (Gabriel *et al.*, 1993).

La première étude concernant le diagnostic prénatal de toxoplasmose congénitale par PCR (gène B1) fut réalisée à partir de l'analyse de liquide amniotique (Grover *et al.*, 1990). Les auteurs obtiennent la meilleur sensibilité de détection par PCR (8/10 soit 80%) comparée à la culture cellulaire (liquide amniotique), l'IgM-ISAGA et l'inoculation à la souris (liquide amniotique ou sang du cordon) qui donnent respectivement 40, 30 et 70%. Par la suite, des études similaires ont confirmé la performance du diagnostic par amplification génique comparée aux autres méthodes traditionnelles de détection. Sur une série de 339 femmes ayant subi une ponction de liquide amniotique (Hohlfeld *et al.*,

1994), les méthodes conventionnelles ont démontré une infection foetale chez 34 d'entre elles et le test PCR était positif dans ces 34 cas. Pour trois autres foetus, seule la PCR était positive et la présence d'une toxoplasmose congénitale a été confirmée par les examens ultérieurs (2 par autopsie et 1 par sérologie). Le test PCR a produit un seul résultat faussement négatif et cela parce qu'il avait été pratiqué trop tôt (quatre semaines après l'infection aigüe de la mère) ; un test PCR ultérieur était positif. Au total, la sensibilité de détection de la PCR était de 97,4% (37/38) contre 89,5% (34/38) pour les méthodes conventionnelles (IgM spécifiques, inoculation à la souris de sang foetal ou de liquide amniotique et culture cellulaire de liquide amniotique). Les auteurs proposent l'évaluation du risque foetal uniquement sur l'amniocentèse et l'inoculation à la souris du liquide amniotique. Ils considèrent que la PCR, sur prélèvement sanguin foetal, n'est plus nécessaire et que le résultat PCR faussement négatif justifie le suivi sérologique postnatal. Dans une autre étude de la toxoplasmose congénitale par PCR (Cazenave *et al.*, 1992) le suivi postnatal s'est également montré très utile. Sur les dix foetus analysés positifs par PCR (liquide amniotique), deux étaient diagnostiqués négatifs par les méthodes conventionnelles (inoculation à la souris, culture cellulaire, IgM spécifiques et marqueurs sanguins non spécifiques). Cependant, les examens postnataux ont confirmé le diagnostic déterminé par PCR.

Bien que la PCR semble être une technique performante, une étude montre dans 2 cas une PCR négative sur deux liquides amniotiques positifs (méthodes sérologiques) (séquence cible TGR1E) (Cristina *et al.*, 1992). Cette constatation renforce l'idée qu'un diagnostic ne peut pas être déterminé qu'à partir d'une seule technique et que les techniques sérologiques ont leur intérêt.

Une étude récente concernant 15 laboratoires, à l'échelle européenne, présente la sensibilité de détection de la PCR à partir d'un modèle expérimental *in vitro* mimant un diagnostic anténatal de toxoplasmose congénitale (Pelloux *et al.*, 1998). Dans cette étude, chaque laboratoire recevait 12 échantillons artificiellement constitués de tachyzoïtes resuspendus dans du liquide amniotique (4 négatifs et 8 positifs). De plus, chaque laboratoire utilisait un protocole PCR variant en fonction de la cible génomique et de la préparation de l'échantillon (prétraitement, vitesse de centrifugation et d'extraction d'ADN). 9 des 15 laboratoires étaient capables de détecter un seul parasite et deux trouvaient tous les échantillons négatifs. De même, 4 laboratoires présentaient au moins 1 résultat faux-positif (moyenne de 11,6%, 7/60). Seulement 2 laboratoires ont été en mesure de détecter correctement les 12 échantillons positifs et les 4 négatifs. Comme les échantillons contenant théoriquement un tachyzoïte étaient obtenus après dilution successive d'une solution mère, les auteurs supposent que les résultats faux-négatifs correspondent à des échantillons contenant moins d'un tachyzoïte. Suite aux résultats

faux-positifs, les auteurs proposent une amélioration des protocoles PCR en utilisant un système d'élimination des produits PCR après leur analyse (système de décontamination "uracyl-N-glycosylase). Dans cette étude, les auteurs constatent qu'il n'y a pas de lien évident entre les méthodologies PCR et leur performance. Pourtant les étapes de purification de l'ADN semble être impliquées dans quelques cas dans la diminution de la sensibilité de détection. Parmi les deux laboratoires n'obtenant que des résultats négatifs, l'un utilisait la nested-PCR avec un gène non répété (*SAG1*), l'autre ne centrifugeait pas ses échantillons. Deux des laboratoires utilisant la nested-PCR présentent des résultats faux-positifs, cette contamination est certainement liée à la manipulation même des tubes. Cette étude démontre surtout qu'il est urgent de standardiser les protocoles PCR pour pouvoir les accréditer dans les laboratoires d'analyse et met également en lumière la nécessité de posséder une banque d'échantillons de référence dans l'évaluation des techniques PCR. Elle démontre, aussi, la nécessité d'éliminer impérativement le risque de faux positifs grâce à des systèmes de décontamination et l'utilisation de pièces séparées, et pour les faux négatifs d'utiliser des contrôles internes d'amplification afin de détecter la présence d'inhibiteurs d'enzyme.

Chez l'enfant ayant une toxoplasmose congénitale, les critères sérologiques permettant de poser le diagnostic sont les suivants : présence de neo-anticorps IgG non décelables en terme de spécificité chez la mère, présence d'IgG de même spécificité que celles décelées chez la mère mais à une concentration relative plus élevée chez l'enfant (association d'IgG maternelles transmises et de néoanti-corps IgG par synthèse foetale ou infantile), présence d'IgM spécifiques différents de ceux de la mère, présence d'IgM de spécificité identique à celles décelées chez la mère mais persistant au delà de 10 jours (la durée de vie des IgM étant de 5 jours) (Pinon *et al.*, 1987). Ainsi, s'il persiste des IgM, il faut rechercher toute manifestation de toxoplasmose congénitale, instituer un traitement systématique et effectuer une surveillance sérologique régulière (Capron *et al.*, 1974). En règle générale, il ne faut jamais relâcher la surveillance d'un enfant à risque avant la disparition totale des anticorps maternels intervenant généralement avant l'âge de 10 mois. Si des anticorps persistent au delà de cette limite d'âge alors l'enfant est certainement infecté (Philippe *et al.*, 1988). De même, à l'arrêt du traitement, la majoration et la réapparition d'anticorps de différents isotypes doivent faire discuter l'opportunité d'une cure complémentaire. L'utilité d'une surveillance des enfants suspects de toxoplasmose un an après leur naissance a été clairement démontrée puisque dans une étude, un tiers (11/33) des atteintes congénitales est dépisté seulement par l'évolution du taux des anticorps au cours de la première année (Pujol *et al.*, 1992). Même infra-clinique, toute toxoplasmose congénitale doit être traitée durant la première année de la vie. Cette attitude est justifiée par la notion de poussées évolutives à moyen et long terme : localisation oculaire notamment dans la majorité des cas, et nerveuse par

l'existence de rebonds sérologiques parfois répétés observés dans plus de 70% des cas , par la survenue d'une synthèse d'anticorps dans l'humeur aqueuse de l'oeil et dans le liquide céphalorachidien (Couvreur, 1993). Dans la mesure où la confirmation d'une toxoplasmose congénitale chez l'enfant par des méthodes sérologiques reste parfois problématique, l'utilisation de la PCR comme outil de diagnostic post-natal doit à l'avenir s'étendre car la présence directe du parasite est et restera toujours une preuve irréfutable.

La toxoplasmose cérébrale est apparue comme une des parasitoses les plus graves chez les sujets immunodéprimés (sidéens, greffés de moelle, transplantés cardiaques ou cardio-pulmonaires, ...). Elle représente un évènement fréquent chez les patients infectés par le VIH dont l'immunodéficiences est avancée (taux de lymphocytes CD4 inférieur à 100 par mm³ de sang). Elle est généralement associée à une réactivation latente du parasite, dûe soit à la rupture de kystes, soit à la reprise de la multiplication de tachyzoïtes (forme libre intracellulaire du parasite). En France, environ 40% des patients développeront une toxoplasmose cérébrale au cours du SIDA (Morlat *et al.*, 1993). Son pronostic très grave en l'absence de traitement a justifié les efforts développés pour améliorer le traitement curatif de l'infection, puis secondairement pour la prévenir.

Notre objectif était de mettre en place un modèle de PCR quantitative pour la détermination d'une charge parasitaire. Nous avons, dans cette perspective, exploité les modèles expérimentaux de toxoplasmose cérébrale chez la souris développés dans notre laboratoire. Parmi les substances actives *in vitro* et *in vivo* sur les kystes cérébraux, l'atovaquone (hydroxynaphthoquinone 566C80) (Derouin *et al.*, 1993) semble être une molécule intéressante. Ce modèle de quantification pourrait être utilisable dans l'analyse de l'impact sur la survie des kystes de diverses thérapeutiques. Il serait alors possible de suivre l'efficacité de traitements antiparasitaires, en cas de phase chronique de toxoplasmose, en les évaluant par un suivi cinétique de la charge parasitaire cérébrale.

INTERET DE LA PCR QUANTITATIVE SUR ADN DANS L'ETUDE DE LA TOXOPLASMOSE

Elaboration d'un modèle de PCR quantitative sur ADN

Dans notre modèle de PCR quantitative sur ADN, nous avons sélectionné un système de PCR quantitative par compétition entre la molécule-cible (gène B1) et un standard interne synthétique. Ce standard possède les deux séquences complémentaires des amorces utilisées pour amplifier la séquence spécifique du gène B1. Par contre, la taille et la nature de la séquence encadrée par les amorces sont complètement différentes de celles de la cible génomique. Cette différence de taille nous permettait de séparer physiquement sur un gel d'agarose, les produits d'amplification issus du standard et de la cible génomique, avant de les quantifier.

Cependant, certaines restrictions ont été formulées quant à l'utilisation de ce type de molécule standard. En effet, les travaux de Pannetier (Pannetier *et al.*, 1993) montrent qu'au delà de la phase plateau, une simple différence de 10 paires de base est suffisante

pour obtenir une divergence d'amplification entre standard et cible. Par contre, les travaux de Bouaboula (Bouaboula *et al.*, 1992) indiquent que la molécule standard et la cible génomique sont amplifiées de la même façon en phase de plateau et ceci, quelque soit la séquence nucléotidique et la taille (jusqu'à 150 pb de différence) entre les amorces. Toutefois, les rapports de quantité ne doivent pas excéder une valeur de 10. Comme notre étude est effectivement réalisée en phase de plateau, nous favorisons dans ces conditions, la probabilité pour que notre molécule standard se comporte comme la molécule cible dans le mélange réactionnel.

Après plusieurs essais à partir d'une quantité connue d'ADN cible, nous avons observé une dérive entre la quantité d'ADN déterminée par PCR quantitative et la quantité d'ADN cible théorique introduite dans le mélange réactionnel. Les premiers essais (figure 40) qui utilisent une charge de bradyzoïtes (estimée à partir d'un nombre de kystes) ont conduit à une surestimation entre valeur calculée et valeur théorique d'un facteur de 92. L'origine de cette surestimation est certainement liée à l'accumulation de plusieurs facteurs d'erreur. Cependant, celui qui semble être le plus fortement impliqué est la trop faible quantité d'ADN initiale des différentes matrices (standard et cible génomique) présente dans le mélange réactionnel. Car la variation dans la quantité finale de produits PCR obtenus, est directement corrélée à la quantité initiale d'ADN présente au premier cycle de l'amplification. En effet, dans cette première étude chaque point de la gamme était réalisé en 6 exemplaires mais au moment de l'analyse des résultats, 50% des mélanges réactionnels étaient inexploitable. Parmi eux, certaines PCR étaient totalement dépourvues de produits d'amplification correspondant soit à la molécule cible, soit à la molécule standard, soit aux deux. Par contre, lors d'une deuxième série (figure 42), où les quantités d'ADN initiales étaient beaucoup plus importantes, tous les mélanges réactionnels donnaient les deux bandes attendues.

Cependant, une surestimation d'un facteur de 75 était retrouvée. L'estimation de la charge parasitaire introduit une source d'erreur non négligeable. En effet, lorsque la quantité d'ADN "connue" est déterminée à partir d'un nombre de tachyzoïtes issus d'une solution mère (sur cellule de thomas) et non plus à partir d'un nombre de bradyzoïtes lui-même estimé à partir d'un nombre moyen de kystes (microscope photonique et broyat cérébral) contenu dans un cerveau de souris, cela permet d'améliorer la quantification : la surestimation n'est plus que d'un facteur 19 (figure 43).

L'absence d'une parfaite corrélation entre quantité d'ADN calculée et théorique repose également sur d'autres facteurs d'erreur difficilement maitrisables. Il s'agit, principalement, de l'imprécision existant sur une mesure en absorbance (par spectrophotomètre) mais également du problème lié aux dilutions successives et

répétés d'une solution mère d'ADN (répartition aléatoire et non homogène de l'ADN dilué). Une autre source possible d'erreur porterait sur le degré de répétition du gène B1. Uniquement déterminé chez la souche RH (Burg *et al.*, 1989), il se pourrait que le nombre de copies de ce gène varie d'une souche à l'autre. Il serait donc nécessaire de contrôler cette répétition sur différentes souches du toxoplasme, dont la souche Prugniaud (source de bradyzoïtes dans notre étude). Ainsi, notre surestimation pourrait éventuellement être associée à un degré de répétition du gène B1, plus élevé chez la souche Prugniaud.

Puisque nous sommes en mesure de suivre l'évolution d'une charge parasitaire cérébrale chez des souris par PCR quantitative, il est possible maintenant de l'appliquer, à titre d'exemple, dans des modèles d'étude de vaccination ou de traitement anti-toxoplasmique.

Application de la PCR quantitative aux modèles d'étude de la toxoplasmose humaine et expérimentale

Actuellement, 3 modèles différents de PCR quantitative sur ADN appliqués à l'étude de la toxoplasmose ont été décrits (Bretagne *et al.*, 1995 ; Luo *et al.*, 1995 et Pyc *et al.*, 1999). Le premier (Bretagne *et al.*, 1995) a permis de quantifier un nombre de parasites présents dans des lavages broncho-alvéolaires chez des patients immunodéprimés. Les auteurs utilisent un système de PCR quantitative par compétition entre un standard interne synthétique (143 pb) et le gène B1 (cible génomique, 115 pb). La construction de ce standard est comparable à la nôtre (Bretagne *et al.*, 1993) car elle utilise des amorces hybrides renfermant une partie de la séquence du gène B1 et une partie d'un plasmide bactérien (M13mp 18). Les produits PCR marqués à la fluoresceine via l'amorce 5', sont séparés sur gel de séquence puis analysés et quantifiés. Le rapport gène B1 sur standard est calculé puis directement comparé à une courbe-étalon. Les différents points de cette courbe correspondent à la variation d'une quantité connue de gène B1 par rapport à une quantité fixe de standard.(5 copies). Sur les 121 patients HIV-positifs analysés, 12 présentent une PCR positive (10%). Parallèlement, le titre de la lactate déshydrogénase sérique (LDH) fut déterminé. Dans cette étude, et bien que la LDH ne soit pas spécifique du parasite, les auteurs montrent qu'il existe une corrélation directe entre la charge parasitaire du toxoplasme et la production de LDH. De même, plus le taux de LDH est élevé et plus les dégâts occasionnés par une toxoplasmose pulmonaire sont importants. La recherche de *Toxoplasma gondii* par PCR quantitative dans les lavages broncho-alvéolaires peut donc aider à confirmer un diagnostic de toxoplasmose alors même que les informations cliniques et les données en imagerie

cérébrale ne permettaient pas de conclure. Elle pourrait également être utilisée pour évaluer la contribution du toxoplasme face à une symptomatologie pulmonaire associée à d'autres pathogènes. Les auteurs remarquent que fréquemment les patients présentant une PCR positive possèdent des anticorps anti-toxoplasme et un nombre de lymphocyte CD4 inférieur ou égal à 500 cellules par mL. Ces signes d'alerte doivent dans ces conditions, conduire à l'instauration rapide d'un traitement prophylactique.

Le deuxième modèle, dans son principe et bien qu'utilisant le gène *SAG1* a également des points communs avec notre démarche. Après amplification, les produits PCR sont séparés sur gel d'agarose puis colorés au BET. Par contre, l'intensité du signal pour chacune des bandes est mesurée par densitométrie. La séparation sur gel d'agarose du standard et de la cible génomique est rendue possible grâce à une différence de taille (151 = 756-605) significative entre ces deux molécules. Le standard est obtenu par "tronçage" du produit PCR issu de la cible génomique, c'est à dire le gène *SAG1*. Le rapport "cible génomique sur standard" est mesuré puis comparé à une courbe-étalon (variation d'une quantité connue du gène *SAG1* pour une quantité constante de standard). Ce modèle de PCR quantitative décrit par Luo (Luo *et al.*, 1995) a également été exploité dans une étude de toxoplasmose oculaire chez l'homme (Norose *et al.*, 1996) et dans une étude expérimentale chez la souris (Luo *et al.*, 1997). Ainsi, ce modèle de PCR quantitative a permis de diagnostiquer une toxoplasmose oculaire chez une personne de 35 ans et de mettre en évidence la présence de quatre tachyzoïtes dans l'humeur aqueuse analysée (Norose *et al.*, 1996). Un avantage supplémentaire de la PCR quantitative, par rapport à une simple PCR, est apporté par la présence d'une molécule standard dans le milieu réactionnel : ceci a pour vocation de servir de contrôle interne et d'éliminer les résultats faussement négatifs. Les auteurs suggèrent d'utiliser ce modèle de PCR quantitative pour étudier la distribution du parasite dans l'organe et connaître la cinétique d'infection en réponse au traitement. Pour finir, ce modèle a permis d'entreprendre une étude expérimentale chez la souris destinée à définir la cinétique d'infection par une souche avirulente (souche Fukaya) de différents organes et tissus (sang, rate, poumons, ganglions mésentériques et cerveau (Luo *et al.*, 1997). Pour les deux souches de souris étudiées (C57BL/6 et BALB/c), la parasitémie maximale est obtenue après 3 jours dans le sang et après 7 jours pour la rate, les poumons et les ganglions mésentériques. Par contre, 14 jours sont nécessaires pour que le cerveau soit atteint. Cependant, le nombre de toxoplasmes dans les cerveaux de souris C57BL/6 est significativement supérieur à celui retrouvé dans ceux de la souche BALB/c. Les auteurs associent cette résistance à l'infection aux gènes du complexe majeur d'histocompatibilité (C57BL/6 : haplotype H-2^b et BALB/c : haplotype H-2^d). La période comprise entre la première et deuxième semaine après infection semble être critique pour la formation de la charge parasitaire et la gravité d'une toxoplasmose cérébrale.

Le dernier modèle de quantification décrit (Pyc *et al.*, 1999), correspond à la mise en place de l'outil sans application à ce jour, en situation de toxoplasmose humaine ou expérimentale. Dans ce modèle de PCR quantitative par compétition, le standard est obtenu par élimination d'un fragment de digestion au niveau du gène *SAG1*. Les auteurs utilisent également deux couples d'amorces dans un système de nested-PCR. Cette dernière permet de renforcer la spécificité des fragments amplifiés vis-à-vis de *Toxoplasma gondii*. Après nested-PCR, les produits d'amplification sont séparés sur gel d'agarose puis visualisés après coloration au BET. Chacune des bandes est ensuite quantifiée à partir d'un film polaroïde en utilisant un scanner. Pour chacune des trois quantités d'ADN génomique testées (1 ng, 50 pg et 1pg), 4 quantités différentes de standard sont utilisées. Chaque rapport "ADN génomique sur standard" est ensuite calculé et reporté sur un graphe en fonction du \log_{10} du standard. La quantité inconnue d'ADN génomique est ensuite déterminée pour une valeur de rapport égale à 1. Les auteurs confirment la correspondance entre la quantité d'ADN quantifiée et la quantité d'ADN théorique introduit dans le mélange réactionnel. A partir de ce modèle de quantification, plusieurs applications cliniques sont envisageables. Comme la PCR quantitative est capable de démontrer une augmentation ou une diminution significative du nombre de parasites au cours d'une infection, une réponse positive permet d'éviter le risque de détection d'organismes non viables ou de parasites issus de kystes quiescents. Il serait donc possible lors d'une toxoplasmose congénitale, de mettre en évidence l'évolution d'une infection à partir de l'analyse du liquide amniotique. De même, la mise en évidence rapide d'une réactivation de kystes toxoplasmiques chez les sujet immunodéprimés, permettrait de développer des actions de préventions. La PCR quantitative en comparaison avec une simple PCR, est en mesure de distinguer une infection quiescente d'une réactivation de la maladie. Finalement, la quantification d'ADN parasitaire pourrait contribuer à la détermination d'une valeur clinique et pronostique corrélée à la gravité de la maladie.

Les différentes souches de *Toxoplasma gondii* peuvent être globalement séparées en souches virulentes et avirulentes. Actuellement, les études concernant la virulence reposent essentiellement sur la description du pathogène à l'encontre des hôtes infectés. Des classifications liées à la virulence ont également été établies sur des critères moléculaires (profil de restriction de certains gènes) ou sur des propriétés physicochimiques de certains enzymes. Par contre, il n'existe pas d'études concernant l'expression de gènes directement impliqués dans la virulence.

INTERETS DE LA RT-PCR QUANTITATIVE DANS L'ETUDE DU POUVOIR PATHOGENE DU TOXOPLASME

Elaboration d'un modèle de RT-PCR quantitative

Pour étudier l'expression des gènes, il est impératif de connaître la cinétique de production des ARNm au cours du cycle d'infection parasitaire mais également de déterminer la cinétique de production et d'activation des molécules fonctionnelles (protéine, ...). Nous nous proposons pour étudier l'expression des ARNm d'utiliser un modèle de RT-PCR quantitative. Cette technique de biologie moléculaire a l'avantage d'être d'une plus grande sensibilité comparée à la technique de référence, le Northern blot.

Nous avons sélectionné comme molécule candidate, la protéine GRA2. Présente dans les granules denses, elle est sécrétée dans la vacuole parasitophore lors de l'invasion de la cellule-hôte par le parasite et pourrait être impliquée dans la virulence des différentes souches du toxoplasme. Notre choix est d'autant plus justifié que récemment, un mutant de la souche virulente RH non kystogène, obtenu par technique de transfection et n'exprimant plus la protéine GRA2, se comporte comme une souche peu virulente kystogène (Mercier *et al.*, 1998).

Notre modèle de RT-PCR quantitative utilisant un standard quasi identique à la molécule cible (4 pb supplémentaires), comprend une étape finale de nested-PCR. Elle permet d'augmenter la spécificité des produits PCR analysés et de marquer à la fluorescéine uniquement les produits d'amplification d'intérêt. Les éventuels produits dits aspécifiques ne seront pas visualisés. Par contre, dans la mesure où il est nécessaire d'ouvrir les tubes réactionnels pour réaliser l'étape de nested-PCR, il faudra prendre des précautions rigoureuses pour éviter de contaminer par contact physique les différents mélanges réactionnels entre eux.

Nous avons préféré développer une molécule étalon sous une forme ADN plutôt qu'ARN. Certes, cette dernière aurait permis d'appliquer les mêmes conditions aux standards et aux molécules cibles lors de l'étape préalable de réverse transcription. Mais pour maintenir un rapport de quantité entre standard et molécule cible inférieur à 10 et obtenir les conditions où ces deux quantités sont proches de l'équivalence, il faudrait couvrir avec le standard, une gamme de plusieurs dilutions de 10 en 10, voire de 5 en 5 puis de 2 en 2 pour affiner la précision et ceci pour chaque ARNm à étudier. Dans la mesure où chaque mélange réactionnel doit être réalisé au moins en double exemplaire, un minimum de 10 tubes serait nécessaire ((1/10, 1/5, 1/1, 5/1 1/0) x2) consommant l'équivalent de 10 µg d'ARNm. Dans ces conditions, la quantification d'un ARNm donné nécessiterait une quantité d'ARN total (ARNm + ARN standard) supérieure à celle utilisée pour le Northern blot (10 µg). Introduire un standard interne dès l'étape de réverse transcription est donc loin d'être aussi performant, impliquant une consommation importante d'ARN. De plus, la manipulation et la conservation des ARN comparées à celles de l'ADN, présentent le risque de dégradation par les ARNases.

Par ailleurs, contrairement à l'étape de PCR, la reverse transcription est une réaction non exponentielle où le nombre de molécules d'ADNc sera directement proportionnel au nombre de molécules d'ARNm initiales (nb ADNc = r x nb ARNm, r = rendement). Si l'activité de l'enzyme est supérieure à 90%, alors la quantité finale d'ADN complémentaire sera proche de la quantité d'ARNm initialement introduite dans le mélange réactionnel. Cette dérive qui pourrait biaiser la quantification peut être maîtrisée par l'étude en parallèle de l'expression d'un gène constitutif comme l'actine. Nous avons sélectionné, pour cette raison, un gène de structure fonctionnellement proche de l'actine, la β tubuline. En introduisant le standard sous sa forme ADN et en le mélangeant à la molécule d'étude (ADNc) après l'étape de la réverse transcription, nous utilisons 1 µg d'ARNm.

Dans le cas du gène *GRA2*, les produits PCR correspondant à l'ADN génomique ont généré deux bandes au lieu d'une seule. Après séquençage la séquence de cette bande supplémentaire ne présente aucune homologie significative avec celle d'un gène connu. Pour éliminer ce produit aspécifique, il sera nécessaire d'augmenter les conditions de stringence au cours de l'étape d'appariement entre l'ADN et les amorces.

Nos travaux nous ont permis d'obtenir la molécule standard pour le gène *GRA2* et le gène β tubuline. Ils nous ont permis également de vérifier l'efficacité des couples d'amorces sélectionnés. Nous devons donc poursuivre l'étude en passant à l'étape de quantification où standard et molécule cible sont mélangés dans le même tube réactionnel.

Approches expérimentales

Pour suivre la cinétique d'expression d'un ARNm, c'est à dire suivre la variation de sa quantité en fonction du temps, il est nécessaire de doser l'ARNm à intervalles de temps réguliers. Comme nous envisageons dans un premier temps d'étudier l'expression de *GRA2* lors de l'étape d'infection (notamment pénétration et multiplication du parasite dans la cellule hôte), deux méthodes opératoires sont envisageables. La première serait de prélever à différents temps un aliquot issu d'une population parasitaire initialement synchrone avant l'infection. La deuxième consisterait à analyser une série de puits contenant chacun un seul parasite et une population de cellules humaines, prélevés à intervalle de temps régulier et de déterminer la quantité d'ARN issu de chaque puit. La sensibilité de la PCR associée à la détection de quantités très faibles de produits amplifiés, permet d'envisager une étude à l'échelle d'un seul parasite. En ce qui concerne l'obtention d'une population synchrone, il sera nécessaire d'utiliser des molécules capables de bloquer le parasite à un stade précis de son cycle. De plus, ces molécules devront être sans effet secondaire sur l'expression de l'ARNm à étudier et leurs modes d'action devront également être réversibles. Seule cette réversibilité permettra une reprise du cycle parasitaire voire une reprise métabolique pour un stade donné. Cependant de telles molécules de "synchronisation" n'ont pas encore été décrites pour le toxoplasme.

L'analyse de la cinétique d'expression de l'ARNm permettra de déterminer si cette expression est constitutive (exemple : ribonucléotide réductase, Alberts *et al.*, 1995), ponctuelle (présence d'un pic individualisé et unique) voire rythmique (présence de pics successifs à intervalles de temps réguliers. (cycline mitotique ; Alberts *et al.*, 1995). Elle contribuera également à rechercher une éventuelle coexpression avec un autre gène ou une expression systématiquement suivie de celle d'un, voire de plusieurs autres gènes et de suspecter alors un possible effet pléiotropique de cette molécule. Il est également intéressant de rechercher d'éventuelles synergies d'expression (une réponse biologique pouvant être modulée selon l'expression de plusieurs gènes).

L'étude des régions promotrices des gènes *GRA* (*GRA1*, *GRA2*, *GRA5* et *GRA6*) a permis de caractériser un motif consensus (A/TGAGACG) (Mercier *et al.*, 1996). Cet élément qui agit en cis quelque soit son orientation, est impliqué dans la formation du complexe de préinitiation de la transcription. L'existence d'un tel élément permet de mieux comprendre pourquoi les protéines GRA présentent un profil d'expression et de sécrétion similaire. La quantification de leur ARNm permettrait de vérifier l'existence d'une synergie d'expression génique et de déterminer son degré d'implication dans la virulence du toxoplasme.

Pour finir, une comparaison entre les différentes souches de *Toxoplasma gondii*, de ce taux d'expression peut être intéressante pour en déterminer le degré de corrélation avec la virulence.

*CONCLUSION
ET
PERSPECTIVES*

Bien que la recherche de nouveaux gènes répétés de *Toxoplasma gondii* ne soit plus une priorité dans la mise en place de diagnostic de toxoplasmose par amplification génique, les gènes histones parasitaires restent médicalement d'un intérêt certain.

Dans le cas de la pathogénèse de la malaria, l'implication des protéines histones de *Plasmodium falciparum* (autre *Apicomplexa*, parasite) a été démontrée. La présence d'anticorps anti-histone dirigés contre ces protéines a été effectivement mise en évidence dans des sérums de patients chroniquement infectés (Longhurst et Holder, 1996). De même, chez l'homme, la fréquence et le titre élevés d'anticorps anti-histone ont été corrélés au syndrome de Felty (Longhurst et Holder, 1996). Les auteurs suggèrent que les histones jouent un rôle dans le syndrome de la splénomégalie tropicale et de la malaria néphritite. C'est pourquoi, il serait intéressant de vérifier si les protéines histones de *Toxoplasma gondii* sont impliquées dans la pathogénèse de la toxoplasmose dans la mesure où un syndrome néphrotique congénital chez un nourrisson de 1 mois associé à une toxoplasmose congénitale a été décrit (Roussel *et al.*, 1987).

Dans cette optique, le clonage du gène histone H4 voire des autres gènes (H2A, H2B et H3) doit être réalisé mais bien sûr en modifiant la stratégie de clonage. Les amorces pourront être déduites de la séquence consensus décrite par Wells (Wells *et al.*, 1991) et les produits PCR seront directement clonés en "TA-Cloning" (cf matériel et méthodes). Une autre stratégie serait d'utiliser comme sonde la séquence H4 obtenue à partir de *Plasmodium falciparum*.

A ce jour, chez *Toxoplasma gondii*, seule une séquence "EST" de 729 pb (EST banque) a été décrite, présentant une homologie significative avec le gène H2A. Le gène histone H4 quant à lui, n'a toujours pas été identifié.

Le clonage et l'expression des gènes d'histones dans des systèmes de traduction *in vitro*, ou *in vivo* par transfection du parasite lui-même, permettraient une production importante des protéines. L'utilisation de la mutagenèse dirigée contribuerait à préciser les régions protéiques reconnues par les anticorps sériques et celles qui seraient directement impliquées dans la maladie.

Les gènes histones peuvent servir de cible pour intégrer une séquence étrangère par recombinaison homologue. Pour cela, il suffit de flanquer la séquence que l'on veut étudier par des séquences histones. Cette cible génomique d'intégration présente de nombreux avantages. Les gènes histones chez les eucaryotes sont des gènes répétés, ainsi après intégration d'une séquence étrangère, les gènes histones ne seraient pas tous touchés et inactivés, permettant de conserver une expression compatible avec la vie de la cellule. Cette répétition génomique permet ainsi d'éviter l'apparition de mutation létale induite par inactivation d'un gène essentiel et dont le nombre de copies serait très

faiblement représenté. Les gènes histones appartiennent à des régions chromatidiennes actives (taux de transcription élevé) mis en évidence (chez la drosophile par exemple) par leur hypersensibilité à l'ADNase I (Kaplan *et al.*, 1993, page 97). En choisissant cette région comme site d'intégration, on évite la possibilité de retrouver le gène d'étude dans une région chromatidienne inactive transcriptionnellement (hétérochromatide) ou faiblement exprimée, compromettant l'expression du gène d'intérêt.

Le test de diagnostic que nous avons mis en place dans notre laboratoire permet de détecter un seul parasite à partir d'échantillons équivalents à des liquides amniotiques.

Le diagnostic anténatal de la toxoplasmose congénitale vise à agir le plus tôt possible pour traiter l'enfant à un moment où les lésions sont inexistantes. Le diagnostic doit être rapide, sensible et fiable. Les différentes études portant sur le diagnostic de toxoplasmose congénitale montre que les meilleurs résultats sont obtenus par la recherche du génome de *Toxoplasma gondii* à partir de liquide amniotique. Au regard des autres techniques diagnostique utilisées en biologie foetale, le choix de la ponction de liquide amniotique semble très judicieux. Il correspond à un geste anodin comparé à la ponction de sang foetal, technique délicate qui nécessite un personnel expérimenté. De plus, en cas de contamination maternelle en début de grossesse, un diagnostic précoce peut être envisagé à partir du liquide amniotique dès la 13^{ième} semaine d'aménorrhée alors qu'il faut généralement attendre la 21^{ième} semaine d'aménorrhée pour réaliser une ponction de sang foetal. A la naissance, la sérologie permet un diagnostic aisé. La PCR permet cependant un diagnostic des contaminations foetales tardives à partir du liquide amniotique prélevé à la naissance, dont les résultats sont supérieurs à ceux de la ponction de sang de cordon. La PCR réalisée à partir du liquide amniotique prélevé lors du bilan biologique anténatal et néonatal constitue un réel progrès dans le diagnostic précoce de la toxoplasmose congénitale.

Le diagnostic de toxoplasmose par PCR chez les sujets sidéens présente également un grand avantage. Il permet à partir de prélèvement sanguin de déterminer précocément une toxoplasmose extracérébrale et ainsi de prévenir essentiellement une toxoplasmose pulmonaire. Le diagnostic d'une toxoplasmose extracérébrale permet également d'orienter le diagnostic de toxoplasmose cérébrale car 41 % des sujets immunodéprimés présentent des manifestations toxoplasmiques cérébrales lors de l'évolution de la maladie (réactivation toxoplasmique et dissémination parasitaire dans l'ensemble de l'organisme) (May *et al.*, 1993).

Le traitement de la toxoplasmose est un pôle très actif de la recherche appliquée. Récemment encore deux nouvelles molécules thérapeutiques dirigées contre la réplication du parasite ont montré leur efficacité dans le traitement de la toxoplasmose

aigüe (quinupristine et dalfopristine ; Khan *et al.*, 1999). De même, le traitement de la toxoplasmose cérébrale est l'objet d'un regain de travaux stimulés par l'extension de l'épidémie d'infection à VIH. C'est pourquoi, la quantification par PCR sur ADN constitue un outil puissant pour suivre l'évolution d'une charge parasitaire dans un organisme et permettre d'apprécier l'efficacité du traitement contre les formes actives du parasite.

Dans un système hôte-parasite constitué, deux génotypes construisent leur phénotype côte à côte, en étroite imbrication. Cette situation donne l'occasion aux gènes du parasite de s'exprimer dans le phénotype de l'hôte et, par conséquent, d'en modifier certains caractères. De même les parasites pour persister vivants dans leur milieu doivent constamment s'adapter à leurs hôtes qui représentent l'essentiel de leurs besoins écologiques. Cette énorme faculté d'adaptation permet de mieux comprendre pourquoi aujourd'hui à l'exception de la variole, l'homme n'est pas parvenu à faire disparaître le moindre de ses parasites (Barbault, 1998). Le meilleur exemple de cet échec est peut-être l'émergence de souches de *Plasmodium* de plus en plus résistantes à la nivaquine, réponse des parasites aux intenses campagnes de prophylaxies. C'est pourquoi, il est nécessaire quelque soit l'étude concernée, d'évaluer le potentiel curatif d'un traitement antitoxoplasmique, d'identifier de nouvelles molécules actives et de réévaluer les médicaments reconnus actifs sur *Toxoplasma gondii*.

L'infection toxoplasmique est l'une des rares maladies parasitaires pour laquelle il existe une immunité à la réinfection durable et spécifique. Le développement d'un vaccin efficace devrait permettre d'éliminer les problèmes de toxoplasmose congénitale humaine en limitant la dissémination des tachyzoïtes au fœtus. Dans le cas de toxoplasmoses chroniques, il permettrait de limiter les risques de réactivation au cours du SIDA (immunité stérilisante sans enkystemment des parasites). Chez l'homme, la recherche d'antigènes protecteurs s'est orientée vers deux grandes classes d'antigènes : antigène de surface et antigènes de sécrétion. Nous avons par RT-PCR montré l'expression d'un antigène de surface SAG3 aux stades tachyzoïtes et bradyzoïtes. La découverte d'une similitude de structure entre les protéines SAG3 et SAG1 (Cesbron-Delauw *et al.*, 1994) permet d'envisager d'utiliser cet antigène de surface dans des applications vaccinales.

La quantification de l'ARNm du gène *GRA2* par RT-PCR quantitative a pour objectif de mettre en évidence une corrélation entre l'expression de ce gène et la virulence des différentes souches de *Toxoplasma gondii*. Cependant et parallèlement, il serait très intéressant de doser la protéine à partir d'une nouvelle méthode de révélation particulièrement sensible, l'immuno-PCR (Peccoud, 1993). Cette technique pourrait

deboucher sur des applications quantitatives (Peccoud, 1993). Un bon exemple serait la comparaison de la cinétique d'expression de l'ARNm avec celle de la protéine et ainsi savoir si la transcription et la traduction sont décalées ou non dans le temps. La présence d'une éventuelle désynchronisation entre ces deux évènements moléculaires, supposerait l'existence de protéines de régulation. De telles protéines sont particulièrement intéressantes car elles constituent un réservoir des cibles potentielles pour des molécules thérapeutiques.

BIBLIOGRAPHIE

Achbarou, A., Mercereau-Puijalon, O. et al. (1991a).

Differential targeting of dense granule proteins in the parasitophorous vacuole of *Toxoplasma gondii*.

Parasitol. **103** : 321-329.

Achbarou, A., Mercereau-Puijalon, O. et al. (1991b).

Characterization of microneme proteins of *Toxoplasma gondii*.

Mol. Biochem. Parasitol. **47** : 223-234

Ajioka, J.W., Boothroyd, J.C., Brunk, B.P., Hehl, A., Hillier, L., Manger, I.A., Marra, M., Overton, G.C., Roos, D.S., Wan, K.L., Waterston, R. and Sibley, L.D. (1998)

Gene discovery by EST Sequencing in *Toxoplasma gondii* reveals sequences restricted to the Apicomplexa

Genome Research **8** : 18-28

Alberts, Bruce., Bray, Dennis., Lewis, Julian., Raff, Martin., Roberts, Keith., et Watson, J.D. (1995).

Biologie moléculaire de la cellule.

Ed : Médecine-sciences Flammarion (troisième édition) : 342.

Allegra, C.J., Boorman, D. et al. (1990).

Interaction of sulfonamide and sulfone compounds with *Toxoplasma gondii* dihydropteroate synthase.

J. Clin. Invest. **85** : 371-379.

Ambroise-Thomas, P. et Garin, J.P. (1984).

Toxoplasmose

Encycl. Med. Chir., Paris, Maladies Infectieuses, 8098 A¹⁰ **4** : 1-12.

Ambroise-Thomas, P. (1990).

Les sondes moléculaires dans l'étude et le diagnostic des maladies parasitaires.

Ann. Parasitol. Hum. Comp.(suppl.) **65** : 83-88.

Ambroise-Thomas, P., Cristina, N. (1991)

Résultats et perspectives apportés par les sondes moléculaires et par l'amplification génique *in vitro* (PCR) dans la toxoplasmose

Bull. Acad.natl. méd. **175** : 39-49

Ambroise-Thomas, P. et Pelloux, H. (1993).

Le toxoplasme et sa pathologie.

Med. Mal. Infect. **23 (special)** : 121-128.

Ancelle, T., Goulet, V., Tirard-Fleury, V., Baril, L., du Mazaubrun, C., Thulliez, Ph., Weislo, M., Carme, B. (1996)

La Toxoplasmose chez la femme enceinte en France en 1995

BEH **51** : 227

Aoki, S., Ikuta, K. and Aoyama, G. (1970).

Experimental ocular toxoplasmosis in mice : immunofluorescent demonstration of *Toxoplasma* antigens in the early stage of infection.

Bull. Osaka Med. Sch. **16** : 74-81.

Aouizerate, F., Cazenave, J., Poirier, L., Verin, Ph., Gervais, C., Lagoutte, F. et Begueret, J. (1991).

Détection Directe de Toxoplames dans l'humeur aqueuse par amplification Génique (PCR).

J. Fr. Ophtalmol **14** : 550-555.

Araujo, F.G. and Remington, J.S. (1987).

Toxoplasmosis in immunocompromised patients.

Eur. J. Clin. Microbiol. **6** : 1-2.

Araujo, F.G. (1991).

Depletion of L3T4⁺ (CD4⁺) T lymphocytes prevents development of resistance to *Toxoplasma gondii* in mice.

Infect. Immun. **59** : 1614-1619.

Asai, T., Kim, T., Kobayashi, M. and Kojima S. (1987).

Detection of nucleoside triphosphate hydrolase as a circulating antigen in sera of mice infected with *Toxoplasma gondii*.

Infect. Immun. **55** : 1332-1335.

Barbault, R. (1998).

La parasitologie à l'ère de la biodiversité : le point de vue d'un écologue.

Bulletin de la Société Française de Parasitologie **16** : 3-14

Beaman, M.H., Wong, S.Y. and Remington, J.S. (1992).

Cytokines, *Toxoplasma* and intracellular parasitism.

Immunological Reviews **127** : 97-117.

Beauchamps, P., Tourvieille, B., Cesbron-Delauw, M.F., and Capron, A. (1997)

The partial sequence of the *Plasmodium falciparum* histon H4 gene

Res. microbiol. **148** : 201-203

Becker, A. M. and Hahlbrock, K. (1989).

Absolute mRNA quantification using the polymerase chain reaction (PCR). A novel approach by a PCR aided transcript titration assay (PATY).

Nucleic Acids Research **17** : 9437.

Beckers, C.J.M., Wakefield, T., Joiner, K.A. (1997)

The expression of *Toxoplasma* proteins in *Neospora caninum* and the identification of a gene encoding a novel rhoptry protein

Mol. and Bioch. Parasitol. **89** : 209-223

Benedetto, N., Auriault, C., Darcy, F., Lando, D., Watier, H. and Capron, A. (1991).

Effect of rIFN- γ and IL-2 treatments in mouse and nude rat infections with *Toxoplasma gondii*.

Eur. Cytokine Net. **2** : 107-114.

Berrebi, A., Reme J.M., Bessières, M.H., Sarramon, M.F., Rolland, M., Diallo, M.S., Decock, C., Demur, C. et Pontonnier, G. (1989).

Diagnostic anténatal de la toxoplasmose : à propos de 77 observations.

Med. et Hyg. 47 : 976-982.

Berrebi, A., Cohen-Khallas, Y., Bessières, M.H., Rolland, M., Sarramon, M.F. et Fournie, A. (1992).

Valeur prédictive des signes non spécifiques d'infection foetale dans la toxoplasmose congénitale.

J. Gynecol. Obstet. Biol. Reprod. 21 : 791-794.

Bessières, M.H., Roques, C., Berrebi, A., Llauro, C., and Seguela, J.P. (1988)

Comment en 1988 poser le diagnostic de toxoplasmose congénitale sur des prélèvements de sang foetaux

Revue française des laboratoires 169 : 19

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

Analysis by immunoblotting of *Toxoplasma gondii* exo-antigens and comparison with somatic antigens.

Parasitol. Res. 78 : 222-228.

Beverley, J.K. and Henry, L. (1971)

Histopathological changes caused by congenital toxoplasmosis in mice

Lyon Méd 225 : 883-887

Binas, M. and Johnson, A.M. (1998).

Characterization of the gene encoding the catalytic subunit of the DNA polymerase alpha from *Toxoplasma gondii*.

Biochemical and Biophysical Research Communications 253 : 628-638.

Black, C.C.M., Catterall, J.R. and Remington, J.S. (1987).

In vivo and in vitro activation of alveolar macrophages by recombinant interferon- γ .

J. Immunol. 138 : 491-495.

Black, C.M., Israelski, D.M., Suzuki, Y. and Remington, J.S. (1989).

Effect of recombinant tumour necrosis factor on acute infection in mice with *Toxoplasma gondii* or *Trypanosoma cruzi*.

Immunology 68 : 570-574.

Blanco, J.C., Angel, S.O., Maero, E., Pszenny, V., Serpente, P. and Garberi, C. (1992).

Cloning of repetitive DNA sequences from *Toxoplasma gondii* and their usefulness for parasite detection.

Am. J. Trop. Med. Hyg 46 (3) : 350-357.

Bloch-Michel, E., Couvreur, J. and Thulliez, Ph. (1992).

Toxoplasmose oculaire.

Editions Techniques - EMC 21230b : 1-8.

- Bohne, W., Gross, U., Ferguson, D.J.P. and Heesemann, J. (1995)**
Cloning and characterization of a bradyzoite-specifically expressed gene (hsp30/bag1) of *Toxoplasma gondii* related to genes encoding small heat-shock proteins of plants
Mol. Microbiol. **16** : 1221-1230.
- Boothroyd, J.C. and Sibley, L.D. (1993).**
Population biology of *Toxoplasma gondii* in "48th forum in immunology".
Res. Immunol. **144** : 14-16.
- Borst, P., Overdulve, J.P., Weijers, P.J., Fase, F.F., and Van den Berg, M. (1984).**
DNA circles with cruciforms from *Isospora (Toxoplasma) gondii*.
Biochim. Biophys. Acta **781** : 100-111.
- Bouaboula, M., Legoux, P., Pességué, B., Delpech, B., Dumont, X., Piechaczyk, M., Casellas, P. and Shire, D. (1992)**
Standardization of mRNA titration using a polymerase chain reaction method involving co-amplification with a multispecific internal control
J. Biol. Chem. **267** : 21830
- Bréchet, C. (1993).**
PCR et virologie : l'utilisation de la PCR pour le diagnostic des hépatites B, C et D.
La PCR : un procédé de réplication *in vitro*. Larzul, D. ; éd. : Tec et Doc Lavoisier, Editions médicales internationales. Collection : génie génétique G2 : 203-228.
- Bretagne, S., Costa, J.M., Vidaud, M., Tran Van Nhieu, J. and Fleury-Feith, J. (1993).**
Detection of *Toxoplasma gondii* by competitive DNA amplification of bronchoalveolar lavage samples.
The journal of Infectious Diseases **168** : 1585-1588.
- Bretagne, S., Costa, J.M., Fleury-Feith, J., Poron, F., Dubreuil-Lemaire, M.L. and Vidaud, M. (1995).**
Quantitative competitive PCR with bronchoalveolar lavage fluid for diagnosis of Toxoplasmosis in AIDS patients.
Journal of Clinical Microbiology **33** : 1662-1664.
- Brézin, A.P., Egwuagu, C.E., Burnier, M., Silveira, C. Mahdi, R.M., Gazzinelli, R.T., Belfort, R. and Nussenblatt, R.B. (1990).**
Identification of *Toxoplasma gondii* in paraffin-embedded sections by the polymerase chain reaction.
American Journal of Ophthalmology **110** : 599-604.
- Brézin, A.P., Silveria C., Thulliez, P., Martins, M., Mahdi, R.M., Belfort, R. and Nussenblatt, R.B. (1991).**
Analysis of aqueous humor in ocular toxoplasmosis.
The new England Journal of Medicine **324** : 699.

Brinkmann, V., Remington, J.S. and Sharma, S.D. (1987).

Protective immunity in toxoplasmosis : correlation between antibody response, brain cyst formation, T-cell activation, and survival in normal and B-cell deficient mice bearing the H-2^k haplotype.

Infect. Immun. **55** : 990.

Brown, C.R. and McLeod, R. (1990).

Class I MHC genes and CD8⁺ T cells determine cyst number in *Toxoplasma gondii* infection.

J. Immunol. **145** : 3438-3441.

Brown, C.R, Hunter, C.A , Estes, R.G, Beckmann, E., Forman, J., David, C. (1995)

Definitive identification of a gene that confers resistance against *Toxoplasma* cyst burden and encephalitis

Immunology **85** : 419-428

Burg, J.L., Perelman, D., Kasper, H.L., Ware, P.L. and Boothroyd, J.C. (1988).

Molecular analysis of the gene encoding the major surface antigen of *Toxoplasma gondii*.

J. Immunol. **141** : 3584-3591.

Burg, J.L., Grover, C.M., Poulety, Ph. and Boothroyd, J.C. (1989)

Direct and Sensitive Detection of a Pathogenic Protozoan, *Toxoplasma gondii*, by Polymerase Chain Reaction.

Journal of Clinical Microbiology **27** : 1787-1792.

Buxton, D. (1993)

Toxoplasmosis : The first commercial vaccine.

Parasitology Today **9** : 335-337.

Candolfi, E., Derouin, F. and Kien, T. (1987).

Detection of circulating antigens in immunocompromised patients during reactivation of chronic toxoplasmosis.

Eur. J. Clin. Microbiol. **6** : 44-48.

Candolfi, E., Arveiller, B. Mandel, J.L. et Kien, T. (1988).

Structure du génome de *Toxoplasma gondii* premiers résultats.

Bull. Soc. FR. Parasitol. **6** : 27-32.

Canessa, A., Del Bono, V., De Leo, P., Piersantelli, N. and Terragne, A. (1992).

Cotrimoxazole therapy of *Toxoplasma gondii* encephalitis in AIDS patients.

Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. **11** : 125-130.

Capron, A., Wattre, P., Vernes, A. et Delaunoy, G. (1974).

Le diagnostic immunologique de la toxoplasmose.

Lille Médical **19** : 147.

Capron, A. and Dessaint, J.P. (1988).

Vaccination against parasitic diseases : some alternative concepts for the definition of protective antigens.

Ann. Inst. Pasteur/Immunol. **139** : 109.

Carreno, R.A., Schnitzler, B.E., Jeffries, A.C., Tenter, A.M., Johnson, A.M. and Barta, J.R. (1998).

Phylogenetic analysis of coccidia based on 18S rDNA sequence comparison indicates that *Isospora* is most closely related to *Toxoplasma* and *Neospora*.

J. Euk. Microbiol. **45** : 184-188.

Carruther, V.B., and Sibley, L.D. (1997)

Sequential protein secretion from three distinct organelles of *Toxoplasma gondii* accompanies invasion of human fibroblasts

Eur. J. Cell. Biol. **73** : 114-123

Catterall, J.R., Hofflin, J.M. and Remington, J.S. (1986).

Pulmonary toxoplasmosis.

Am. Rev. Respir. Dis. **133** : 704-705.

Catterall, J.R., Black, C.M., Leventhal, J.P., Rizk, N.W., Wachtel, J.S. and Remington, J.S. (1987).

nonoxidative microbicidal activity in normal human alveolar and peritoneal macrophages.

Infect. Immun. **55** : 1635-1640.

Cazenave, J., Bessières, M.H., Sourrue, D., Cheyrou, A. et Begueret, J. (1990).

Détection de toxoplasmes par amplification d'ADN. Un exemple d'application des techniques de biologie moléculaire au diagnostic parasitaire.

Revue française des laboratoires **209** : 118-126.

Cazenave, J., Cheyrou, A., Aouizerate, F., Poirier, L. and Verin, P. (1992a).

Detection of *Toxoplasma* in Aqueous Humor by Using the Polymerase Chain Reaction.

Ann Biol. Clin. **50** : 357-358.

Cazenave, J., Forestier, Fr., Bessières, M.H., Broussin, B. and Begueret, J. (1992b).

Contribution of a new PCR Assay to the Prenatal Diagnosis of Congenital Toxoplasmosis.

Prenatal Diagnosis **12** : 119-127.

Cesbron-Delauw, M.F., Guy, B. et al. (1989).

Molecular characterization of a 23-kilodalton major antigen secreted by *Toxoplasma gondii*.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA **86** : 7537-7541.

Cesbron-Delauw, M.F., Tomavo, S., Beauchamps, P., Fourmaux, M.P., Camus, D., Capron, A. and Dubremetz, J.-F. (1994).

Similarities between the Primary Structures of Two Distinct Major Surface Proteins of *Toxoplasma gondii*.

The Journal Biological Chemistry **269** : 16217-16222.

Chang, H.R., Grau, G.E. and Pechère, J.C. (1990).

Role of TNF and IL-1 in infections with *Toxoplasma gondii*.

Immunology **69** : 33-37.

Chang, H.R., Pechere, J.C. and Piguet, P.F. (1992).

Role of Tumor Necrosis Factor in chronic murine *Toxoplasma gondii* encephalitis.

Immunol. Infect. Dis. **2** : 61-68.

Chardès, T., Velge-Roussel, F. et al. (1993).

Mucosal and systemic cellular immune responses induced by *Toxoplasma gondii* antigens in cyst orally infected mice.

Immunol. **78** : 421-429.

Charif, H., Darcy, F. et al. (1990).

Toxoplasma gondii : characterization and localization of antigens secreted from tachyzoites.

Exp. Parasitol **71** : 114-124.

Chelly, J., Kaplan, J.C., Maire, P., Gautron, S. and Kahn, A. (1988).

Transcription of the dystrophin gene in human muscle and non-muscle tissues.

Nature **333** : 858-860.

Chelly, J., Montarras, D., Pinset, C., Berwald-Netter, Y., Kaplan, J.C. and Kahn, A. (1990).

Quantitative estimation of minor mRNAs by cDNA-polymerase chain reaction. Application to dystrophin mRNA in cultured myogenic and brain cells.

Eur. J. Biochem **187** : 691-698.

Chien, A., Edgar, D.B. and Trela, J.M. (1976).

Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*.

Journal of Bacteriology **127** : 1550-1557.

Ciongolani, A., De Luca, A., Ammassari, A. Murri, R., Linzalone, A., Grillo, R. and Antinori, A. (1996).

PCR detection of *Toxoplasma gondii* DNA in CSF for the differential diagnosis of AIDS-related focal brain lesions.

J. Med. Microbiol. **45** : 472-476.

Cornelissen, A.W.C.A., Overdulve, J.P. et al. (1984).

Determination of nuclear DNA of five Eucoccidian parasites, *Isospora (Toxoplasma) gondii*, *Sarcocystis cruzi*, *Eimeria tenella*, *E. acervulina* and *Plasmodium berghei*, with special reference to gamontogenesis and meiosis in *I. (T). gondii*.

Parasitol **88** : 531-553.

Couvreur, J., Desmonts, G. et Aron-Rosa, D. (1984).

Le pronostic oculaire de la toxoplasmose congénitale : rôle du traitement.

Ann. Pédiatr. (Paris) **31** : 855-858.

Couvreur, G., Sadak, A., Fortier, B. and Dubremetz, J.F. (1988a).

Surface antigens of *Toxoplasma gondii*.

Parasitology **97** : 1-10.

Couvreur, G., Desmonts, G. and Thulliez, P. (1988b).

Prophylaxis of congenital toxoplasmosis. Effects of Spiramycin on placental infection.

J. Antimicrob. Chemother. **22** : 193.

Couvreur, J. (1993).

Toxoplasmose congénitale. Prise en charge et devenir.

Med. Mal. Infect. **23 spécial** : 176-182.

Cowen, D. and Wolf, A. (1950).

Experimental congenital toxoplasmosis. - I. The vagina as a portal of entry of *Toxoplasma* in the mouse.

J. exp. Med. 393-402.

Cristina-Curt Grand gaudin, N. and Ambroise-Thomas, P. (1990)

Les sondes moléculaires en parasitologie : perspectives d'application au diagnostic de la toxoplasmose

Bull. Soc. Path. Ex. 83 : 177-186

Cristina, N., Oury, B. et al. (1991a).

Restriction-fragment-length polymorphisms among *Toxoplasma gondii* strains.

Parasitol. Res. 77 : 266-268.

Cristina, N., Liaud, M.F., Santoro, F., Oury, B. and Ambroise-Thomas, P. (1991b).

A family of repeated DNA sequences in *Toxoplasma gondii* : cloning, sequence analysis and use in strain characterization.

Exp. Parasitol 73 : 73-81.

Cristina, N., Derouin, F., Pelloux, H., Pierce, R., Cesbron-Delauwn, M.F. et Ambroise-Thomas, P. (1992).

Detection de *Toxoplasma gondii* chez des patients sidéens par la technique de "Polymerase Chain Reaction" (PCR), à l'aide de la Séquence répétée TGR1_E.

Path Biol. 40 : n°1 52-55.

Curtis, S.E. and Rawson, J.R.Y. (1981).

Characterization of the nuclear ribosomal DNA of *Euglena gracilis*.

Gene 15 : 237-247.

Daffos, F. et Forestier, F. (1988a).

Maladies infectieuses. In : Médecine et biologie du foetus humain.

Ed. Maloine (Paris) 233-240.

Daffos, F., Forestier, F., Capella-Pavlovsky, M., Thulliez, P., Aufrant, P., Valenti, D. and Cox, W.L. (1988).

Prenatal management of 746 pregnancies at risk for congenital toxoplasmosis.

N. Engl. J. Med. 318 : 271.

D'andrea, A., Aste-Amezaga, M., Valiante, N.M., Ma, X., Kubin, M., and Trinchieri, G. (1993)

interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon γ -production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells.

J. Exp. Med. 178 : 1041-1048.

- Danneman, B.R., Morris, V.A., Araujo, F.G. and Remington, J.S. (1989).**
Assessment of human natural killer and lymphokine-activated killer cell cytotoxicity against *Toxoplasma gondii* trophozoites and brain cysts.
The J. Immunol. **143** : 2684-2691.
- Darcy, F., Deslée, D. et al. (1988).**
Induction of a protective antibody-dependent response against toxoplasmosis by *in vitro* excreted/secreted antigens from tachyzoites of *Toxoplasma gondii*.
Parasitol. Immunol. **10** : 553-567.
- Darcy, F., Charif, H., Caron, D., Deslee, D., Pierce, R.J., Cesbron, M.F., Decoster, A. and Capron, A. (1990).**
Identification and biochemical characterization of antigens of tachyzoites and bradyzoites of *Toxoplasma gondii* with cross-reactive epitopes.
Parasitol. Res. **76** : 473-478.
- Darcy, F., Fourdrinier, F. et al. (1991)**
Diagnostic value of specific IgA antibodies in AIDS patients with *Toxoplasma* infection : a bicentric evaluation.
Immunol. Letters **30** : 345-348.
- Darcy, F., Maes, P. et al. (1992).**
Protection of mice and nude rats against toxoplasmosis by a multiple antigenic peptide construction derived from *Toxoplasma gondii* P30 antigen.
The J. Immunol. **149** : 3636-3641.
- Darcy, F. and Zenner, L. (1993).**
Experimental models of toxoplasmosis.
48th FORUM IN IMMUNOLOGY
Res. Immunol. **144** :
- Dardé, M.L., Bouteille, B. et al. (1988).**
Isoenzymic characterization of seven strains of *Toxoplasma gondii* by isoelectrofocusing in polyacrylamide gels.
Am. J. Trop. Med. Hyg. **39** : 551-558.
- Dardé, M.L., Bouteille, B. et al. (1992).**
Isoenzyme analysis of 35 *Toxoplasma gondii* isolates and the biological and epidemiological implications.
J. Parasitol **78** : 786 -794.
- De Carvalho, L. and De Souza, W. (1989).**
Cytochemical localization of plasma membrane enzyme markers during interiorization of tachyzoites of *Toxoplasma gondii* by macrophages.
J. Protozool **36** : 164.
- Decoster, A., Darcy, F., Caron, A. and Capron, A. (1988a).**
IgA antibodies against P30 as markers of congenital and acute toxoplasmosis.
The Lancet **2** : 1104-1107.

Decoster, A., Darcy, F. et al. (1988b).

Recognition of *Toxoplasma gondii* excreted and secreted antigens by human sera from acquired and congenital toxoplasmosis : identification of markers of acute and chronic infection.

Clin. Exp. Immunol. **73** : 376-382.

Decoster, A., Slizewicz, B. et al. (1991).

Platelia-Toxo IgA a new kit for early diagnosis of congenital toxoplasmosis by detection of anti-P30 immunoglobulin A antibodies.

J. Clin. Microbiol. **29** : 2291-2295.

Decoster, A., Darcy, F., Caron, A., Vinatier, D., Houze de l'Aulnoit, D., Vittu, G., Niel, G., Heyer, F., Lecolier, B., Delcroix, M., Monnier, J.C., Duhamel, M. and Capron, A. (1992).

Anti-P30 IgA antibodies as prenatal markers of congenital *toxoplasma infection*.

Clin. Exp. Immunol. **87** : 310-315.

De Lamballerie, X., Bollet, C., De Micco, P.(1993).

PCR et bactériologie : les applications médicales de la PCR.

La PCR : un procédé de répllication *in vitro*. Larzul, D. ; éd. : Tec et Doc Lavoisier, Editions médicales internationales. Collection : génie génétique G2 : 251-261.

De Melo, E.F., and Souza, W. (1997)

Relationship between the host cell endoplasmic reticulum and the parasitophorous vacuole containing *Toxoplasma gondii*

Cell. Stuct. Funct. **22** : 317-323

Denkers, E.Y., and Sher, A.(1997)

Role of natural killer and NK1(+) T-cells in regulating cell-mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection

Biochem. Soc. Trans. **25** : 699-703

Denney, C.F., Eckmann, L. and Reed, S. (1999).

Chemokine secretion of human cells in response to *Toxoplasma gondii* infection

Infection and Immunity **67** : 1547-1552

Denton, H., Brown, S.M.A., Robert, C.W., Alexander, J., Mc Donald, V., Thong, K.W., Coombs, G.H. (1996).

Comparison of the phosphofructokinase and pyruvate kinase activities of *Cryptosporidium parvum*, *Eimeria tenella* and *Toxoplasma Gondii*.

Mol. and Bioch. Parasitol. **76** : 23-29.

Derouin, F., Mazon, M.C. and Garin, Y.J. (1987).

Comparative study of tissue culture and mouse inoculation methods for demonstration of *Toxoplasma gondii*.

J. Clin. Microbiol. **25** : 1597-1600.

Derouin F., Thulliez, P., Candolfi, E., Daffos, F. and Forestier, F. (1988).

Early prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis using amniotic fluid samples and tissue culture.

Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. **7** : 423-425.

Derouin, F. and Chastang, C. (1989).

In vitro effects of folate inhibitors on *Toxoplasma gondii*.
Antimicrob. Agents and Chemother. **33** : 1753.

Derouin, F., Chau, F. et al. (1993).

Bases expérimentales du traitement de la toxoplasmose.
Med. Mal. Infect. **23 spécial** : 162-169.

Desmots, G., Couvreur, J., Alison, F., Baudelot, J., Gerbeaux, J. et Lelong, M. (1965).

Etude épidémiologique sur la toxoplasmose : de l'influence de la cuisson des viandes de boucherie sur la fréquence de l'infection humaine.
Rev. Fr. Etud. Clin. Biol. **10** : 952.

Desmots, G., Naot, Y., et Remington, J.S., (1972).

Diagnostic biologique de la toxoplasmose humaine.
Pharm; Biol. **6** : 43.

Desmots, G., Beaufine-Ducrocq. H., Couzineau. P. and Peloux, Y., (1974).

Anticorps toxoplasmiques naturels.
Presse Med. **3** : 1547-1549.

Desmots, G., Naot, Y. and Remington, J.S. (1981).

Immunoglobulin M-immunosorbent agglutination assay for diagnosis of infectious diseases : diagnosis of acute congenital and acquired *Toxoplasma* infections.
J. Clin. Microbiol. **14** : 486-491.

Desmots, G., Daffos, F., Forestier, F., Capella-Pavlovsky, M., Thulliez, P. and Chartier, M. (1985).

Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis.
The Lancet **1** : 500-503.

Dimier, I.H., and Bout, D.T. (1997)

Inhibition of *Toxoplasma gondii* replication in IFN- α activated human intestinal epithelial cells
Immunol. Cell. Biol. **75** : 511-514

Dobrowolski, J.M., Niesman, I.R., and Sibley, L.D. (1997b)

Actin in the parasite *Toxoplasma gondii* is encoded by a single copy gene, ACT1 and exists primarily in a globular form
Cell. Motil. Cytosk. **37** : 253-262

Dubey, J.P. and Frenkel, J.K. (1973).

Experimental *Toxoplasma* infection in mice with strains producing oocysts.
The J. Parasitol. **59** : 505-512.

Dubey, J.P. and Frenkel, J.K. (1976).

Feline toxoplasmosis from acutely infected mice and the development of *Toxoplasma* cysts.
J. Protozool **23** : 537.

Dubey, J.P. and Beattie, C.P. (1988).
Toxoplasmosis of animals and man.
CRC Press. Inc., Boca Raton, FL.

Dubey, J.P. and Shen, S.K. (1991).
Rat model of congenital toxoplasmosis.
Infect. and Immun. **59** : 3301-3302.

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

Dubremetz, J.F., Achbarou, A. et al. (1993).
Kinetics and pattern of organelle discharge during *Toxoplasma gondii*-host cell interaction.
Parasitol. Res. **79** : 402-408.

Dunn, D., Wallon, M., Peyron, F., Petersen, E., Peckham, C., Gilbert, R. (1999)
Mother-to-child transmission of toxoplasmosis : risk estimates for clinical counselling
The Lancet **353** : 1829-1833

Dupouy-Camet, J., Lavareda De Souza, S., Bougnoux, M.E., Mandelbrot, L., Hennequin, C., Dommergues, M., Benarous, R. and Tourte-Schaefer, C. (1990).
Preventing congenital toxoplasmosis.
The Lancet **336** : 1017-1018.

Dupouy-Camet, J., Bougnoux, M.E., Lavareda de Souza, S., Thulliez, P., Dommergues, M., Mandelbrot, L., Ancelle, T., Tourte-Schaefer, C. and Benarous, R. (1992).
Comparative value of Polymerase Chain Reaction and conventional biological tests for the prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis.
Ann Biol. Clin. **50** : 315-319.

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

Dupouy-Camet, J., Lavareda De Souza, S., Maslo, C., Paugam, A., Saimot, A., G., Benarous, R., Tourte-Schaefer, C. and Derouin, F. (1993b).
Detection of *Toxoplasma gondii* in venous blood from AIDS patients by Polymerase Chain Reaction.
Journal of Clinical Microbiology **31** : 1866-1869.

Egea, N., and Lang-Unnasch, N. (1995)
Phylogeny of the large extrachromosomal DNA of organisms in the phylum apicomplexa
J. Euk. Microb. **42** : 679-684

Eichenwald, H. (1948).
Experimental toxoplasmosis. I. Transmission of the infection in utero and through the milk of lactating female mice.
Amer. J. Dis. Child. **76** : 307-315.

Ellis, J.T., Luton, K., Baverstock, P.R., Whitworth, G., Tenter, A.M. and Johnson, A.M. (1995).

Phylogenetic relationships between *Toxoplasma* and *Sarcocystis* deduced from a comparison of 18S rDNA.

Parasitology **110** : 521-528.

Ellis, J.T., Amoyal, G., Ryce, C., Harper, P.A.W., Clough, K.A., Homan, W.L. and Brindley, P.J. (1998).

Comparison of the large subunit ribosomal DNA of *Neospora* and *Toxoplasma* and development of a new genetic marker for their differentiation based on the D2 domain.

Molecular and Cellular Probes **12** : 1-13.

El Sayed Khalifa, H., Roth, A., Roth, B., Arasteh, K.N. and Janitschke, K. (1994).

Value of PCR for evaluating occurrence of parasitemia in immunocompromised patients with cerebral and extracerebral Toxoplasmosis.

Journal of Clinical Microbiology **32** : 2813-2819.

Erlich, H.A., Gelfand, D.H. and Saiki, R.K. (1988).

Specific DNA amplification.

Nature **331** : 461-463.

Eron, J.J., Gorczyca, P., Kaplan, J.C. and D'Aquila, R.T. (1992).

Susceptibility testing by polymerase chain reaction DNA quantitation : a method to measure drug resistance of human immunodeficiency virus type 1 isolates.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA **89** : 3241-3245.

Ferguson, D.L.P. and Hutchison, W.M. (1987a).

An ultrastructural study of the early development and tissue cyst formation of *Toxoplasma gondii* in the brains of mice.

Parasitol. Res. **73** : 483-491.

Ferguson, D.L.P., Hutchison, W.M. and Pettersen, E. (1989).

Tissue cyst rupture in mice chronically infected with *Toxoplasma gondii*.

Parasitol. Research. **75**. 599.

Fernandez- Martin, J., Leport, C., Morlat, P., Meyohas, M.C., Chauvin, J.P. and Vilde, J.L. (1991).

Pyrimethamine-clarithromycin combination for therapy of acute *Toxoplasma* encephalitis in patients with AIDS.

Antimicrob. Agents Chemother. **35** : 2049-2052.

Ferrer, A., Hoebeke, J. and Bout, D. (1999).

Purification and characterization of two α -amylases from *Toxoplasma gondii*.

Experimental Parasitology **92** : 64-72.

Fishera, M.E., Ross, D.S. (1997)

A plastid organelle as a drug target in apicomplexan parasites

Nature **390** : 407-409

- Filice, G, A., Hitt, J, A., Mitchell, Ch. , D., Blackstad, M. and Sorensen, Sc. W. (1993).**
Diagnosis of toxoplasma parasitemia in patients with AIDS by gene detection after amplification with Polymerase Chain Reaction.
Journal of Clinical Microbiology **31** : 2327-2331
- Filice, G.,A., Clabots, C.,R., Goni-Laguardia, R.,O., and Pomeroy, C.(1999)**
Changes in cytokine level during reactivation of *Toxoplasma gondii* infection in lungs
Infect. Immun. **67** : 2082-2089
- Fischer, H.G., Stachelhaus, S., Sahm, M., Meyer, H.E., Reichmann, G. (1998).**
GRA7, an excretory 29 kDa *Toxoplasma gondii* dense granule antigen released by infected host cells.
Mol. and Bioch. Parasitol. **91** : 251-262.
- Fortier, B., Aïssi, E., Ajana, F., Dieusart, P., Denis, P., Martin de Lassalle, E., Lecomte-Houcke, M. and Vinatier, D. (1991a).**
Spontaneous abortion and reinfection by *Toxoplasma gondii*.
The Lancet **338** :444.
- Fortier, B., Pinto-Sousa, M.I. et Ajana, F. (1991b).**
Toxoplasma gondii : 2 cas de recontamination sur terrain immun.
Presse Med. **20** :2109.
- Foudrinier, F., Aubert, D., Lemaire, P., Pinon, J.M. (1993)**
Implantation d'une technique PCR appliquée à la detection d'ADN toxoplasmique au laboratoire de parasitologie du CHR de Reims. Intérêt et limites.
Biologie prospective : 109-112
- Foulet, A., Zenner, L., Darcy, F., Cesbron-Delauw, M.F., Capron, A. and Gosselin B. (1994).**
Pathology of *Toxoplasma gondii* infection in the nude rat : an experimental model of toxoplasmosis in the immunocompromised host .
Path. Res. Pract. **190** : 775-781.
- Fourmaux, M.N., Réguet-Garcia, N., Mercereau-Puijalon, O. and Dubremetz, J.F. (1996).**
Toxoplasma gondii Microneme proteins : Gene cloning and possible function.
Toxoplasma gondii, U. Groos, ed. (Springer, Heidelberg Germany) **219** : 55-57.
- Fox, G.E., Stackebrandt, E., Hespell, R.B., Gibson, J., Maniloff, J., Dyer, T.A., Wolfe, R.S., Balch, W.E., Tanner, R.S., Magrum, L.J., Zablen, L.B., Blakemore, R., Gupta, R., Bonen, L., Lewis, B.J., Stahl, D.A., Luehrsen, K.R., Chen, K.N. and Woese, C.R. (1980).**
The Phylogeny of Prokaryotes.
Science **209** : 457-463.
- Franzen, C., Altfeld, M., Hegener, P., Hartmann,P., Arendt, G., Jablonowski, H., Rockstroh, J., Diehl, V., Salzberger, B. and Fätkenheuer, G. (1997).**
Limited value of PCR for detection of *Toxoplasma gondii* in blood from human immunodeficiency virus-infected patients.
Journal of Clinical Microbiology **35** : 2639-2641.

Frenkel, J.K. (1967).

Adoptive immunity to intracellular infection.

The J. Immunol. **98** : 1309.

Frenkel, J.K., Dubey, J.P. and Miller, N.L. (1969).

Toxoplasma gondii : fecal forms separated from eggs of the nematode *Toxocara cati*.

Science **164** : 432.

Frenkel, J.K., Dubey, J.P. and Miller, N.L. (1970).

Toxoplasma gondii in cats : fecal stages identified as coccidian oocysts.

Science **167** : 893.

Frenkel, J.K. (1973).

Toxoplasmosis : parasite life cycle, pathology and immunology.

The Coccidia (D.M. Hammond, ed.) University Park Press, Baltimore. p. 343.

Frenkel, J.K., Nelson, B.M. and Arias-Stella, J. (1975).

Immunosuppression and toxoplasmic encephalitis.

Clinical and experimental aspects.

Hum. Pathol. **6** : 97.

Frenkel, J.K. (1988).

Pathophysiology of toxoplasmosis.

Parasitol. Today **4** : 273.

Frenkel, J.K. (1990).

Toxoplasmosis in human beings.

J. Am. Vet. Med. Assoc. **196** : 240.

Fricker-Hidalgo, H., Pelloux, H., Bost, M., Goullier-Fleuret, A., Ambroise-Thomas, P. (1996)

Toxoplasmose congénitale : apport du suivi biologique postnatal.

Presse Méd **25** : 1868-1872

Fujii, H., Kamiyama, T. and Hagiwara, T. (1983).

Species and strain differences in sensitivity to *Toxoplasma* infection among laboratory redents.

Jap. J. Med. Sci. Biol. **36** : 343-346.

Gabriel, R., Harika, G., Carré-Pigeon, F., Quéreux, C. et Wahl, P. (1993).

L'amniocentèse pour étude du caryotype foetal avant 16 semaines d'aménorrhée.

J. Gynecol. Obstet. Biol. Reprod. **22** : 169-171.

Gagnon, S., Levesque, R.C. et al. (1993).

Molecular cloning, complete sequence of the small subunit ribosomal RNA coding region and phylogeny of *Toxoplasma gondii*.

Mol. Biochem. Parasitol. **60** : 145-148.

Gagnon, S., Morency, M.J., Bourbeau, D. and Levesque, R.C. (1996).

Toxoplasma gondii : structure and characterization of the 26S ribosomal RNA and peptidyl transferase domain.

Experimental parasitology **83** : 346-351.

Gagnon, S., Bourbeau, D. and Levesque, C. (1996)

Secondary structures and features of the 18S, 5.8S and 26S ribosomal RNAs from the Apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*

Gene **173** : 129-135

Gallois, Y., Foussard, F., Girault, A., Hodberg, J., Tricaud, A., Mauras, G. and Motta, C. (1988).

Membrane fluidity of *Toxoplasma gondii* : a fluorescence polarization study.

Biol. Cell. **62** : 11.

Gazzinelli, R.T., Hakim, F.T., Hieny, S., Shearer, G.M. and Sher, A. (1991).

Synergistic role of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes in IFN- γ production and protective immunity induced by an attenuated *Toxoplasma gondii* vaccine.

J. Immunol. **146** : 286-292.

Gazzinelli, R.T., Hartley, J.W. et al. (1992).

Opportunistic infections and retrovirus-induced immunodeficiency : studies of acute and chronic infections with *Toxoplasma gondii* in mice infected with LP-BM5 murine leukemia viruses.

Infect. Immun. **60** : 4394-4401.

Gazzinelli, R.T., Bala, S., Steven, R., Baseler, M., Wahl, L., Kovac, J., and Sher, A. (1995)

HIV infection suppresses type 1 lymphokine and IL-12 responses to *Toxoplasma gondii* but fails to inhibit the synthesis of other parasite-induced monokines

The J. of Immun. **155** : 1565-1574

Gazzinelli, R.T., Wysocka, M., Hieny, S., et al (1996)

In the absence of endogenous IL-10, mice acutely infected with *Toxoplasma gondii* succumb to a lethal immune response dependent on CD4⁺ T cells and accompanied by overproduction of IL-12, IFN- γ , and TNF- α

The J. of Imm. **157** : 798-805

Gilliland, G., Perrin, S., Blanchard, K. and Bunn, H.F. (1990).

Analysis of cytokine mRNA and DNA : detection and quantitation by competitive polymerase chain reaction.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA **87** : 2725-2729.

Gray, F., Gherardi, R. et al. (1989).

Diffuse "encephalitic" cerebral toxoplasmosis in AIDS. Report of four cases.

J. Neurol. **236** : 273-277.

Grimwood, J., and Smith, J.E. (1996)

Toxoplasma gondii : The role of parasite surface and secreted proteins in host cell invasion

Int. J. Parasitol. **26** : 169-173

Groß, U., Müller, W.A. et al. (1991).

Identification of a virulence-associated antigen of *Toxoplasma gondii* by use of a mouse monoclonal antibody.

Infect. Immun. **59** : 451-4516.

Groß, U., Roggenkamp, A., Janitschke, K. and Heesemann, J. (1992).

Improved sensitivity of the polymerase chain reaction for detection of *Toxoplasma gondii* in biological and human clinical specimens.

Eur. J. Clin. Microbiol. Dis. **11** : 33-39.

Grover, C , M., Thulliez, P., Remington, J , S. and Boothroyd J , C. (1990).

Rapid Prenatal Diagnosis of Congenital *Toxoplasma* infection by Using Polymerase Chain Reaction and Amniotic Fluid.

Journal of Clinical Microbiology **28** : 2297-2301.

Guay, J.M., Huot, A. et al. (1992).

Physical and genetic mapping of cloned ribosomal DNA from *Toxoplasma gondii* : primary and secondary structure of the 5S gene.

Gene **114** : 165-171.

Guo, Z.G. and Johnson, A.M. (1995).

Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* strains by random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction.

Parasitology **111** : 127-132.

Guo Z.G. and Johnson, A.M. (1995).

Genetic comparison of *Neospora caninum* with *Toxoplasma* and *Sarcocystis* by random amplified polymorphic DNA-polymerase.

Parasitol. Res. **81** : 365-370.

Guy, E.C. and Joynson, D.H.M. (1995).

Potential of the polymerase chain reaction in the diagnosis of active toxoplasma infection by detection of parasite in blood.

The journal of infectious diseases **172** : 319-322.

Hackstein, J.H.P., Mackenstedt, U., Mehlhorn, H., Meijerink, J.P.P., Schubert, H. and Leunissen, J.A.M. (1995).

Parasitic apicomplexans harbor a chlorophyll a6D1 complex, the potential target for therapeutic triazines.

Parasitol Res. **81** : 207-216.

Handman, E. and Remington, J.S. (1980).

Antibody responses to *toxoplasma* antigens in mice infected with strains of different virulence.

Infect. Immun. **29** : 215-220.

Handman, E., Goding, J.W. et al. (1980a).

Detection and characterization of membrane antigens of *Toxoplasma gondii*.

J. Immunol. **124** : 2578-2583.

Hauser, W.E. and Tsai, V. (1986).

Acute *Toxoplasma* infection of mice induces spleen NK cells that are cytotoxic for *T. gondii* *in vitro*
J. Immunol. **136** : 313.

Hehl, A., Krieger, T., Boothroyd, J.C. (1997)

Identification and characterization of SRS1, a *Toxoplasma gondii* surface antigen upstream of and related to SAG1
Mol. and Bioch. Parasitol. **89** : 271-282

Hérion, P., Hernandez-pando, R. et al. (1993).

Subcellular localization of the 54 kDa antigen of *Toxoplasma gondii*.
J. Parasitol. **79** : 216-222.

Hisaeda, H., Sakai, T., Ishikawa, H., Maekawa, Y., et al (1997)

Heat shock protein 65 induced by $\gamma\delta$ T cell prevents apoptosis of macrophages and contributes to host defense in mice infected with *Toxoplasma gondii*
The J. of Imm. **159** : 2375-2381

Hitt, J.A. and Filice, G.A. (1992).

Detection of *Toxoplasma gondii* parasitemia by gene amplification, cell culture, and mouse inoculation.
Journal of clinical microbiology **30** : 3181-3184.

Ho, S.N., Hunt, H.D., Horton, R.M., Pullen, J.K. and Pease, L.R. (1989).

Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction.
Gene **77** : 51-59.

Hofflin, J.M., Conley, F.K. and Remington, J.S. (1987).

Murine model of intracerebral toxoplasmosis.
J. Infect. Dis. **155** : 550-557.

Hohlfeld, P., Mac Aleese, J., Capella-Pavlovski, M., Giovandrandi, Y., Thulliez, P., Forestier, F. and Daffos, F. (1991).

Fetal toxoplasmosis : ultrasonic signs.
Ultras. Obstet. Gynecol **1** : 241-244.

Hohlfeld, P., Daffos, F., Costa, J.M., Thulliez, Ph., Forestier, Fr. and Vidaud, M. (1994).

Prenatal Diagnosis of Congenital Toxoplasmosis with a Polymerase Chain Reaction Test on Amniotic Fluid.
The New England Journal of Medicine **331** : 695-699.

Holland, G.N., O'Connor, G.R., Diaz, R.F., Minasi, P. and Wara, W.M. (1988).

Ocular toxoplasmosis in immunosuppressed nonhuman primates.
Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. **29** : 835-842.

Holland, G.N. (1989).

Ocular toxoplasmosis in the immunocompromised host.
Int. Ophthalmol. **13** : 399-402.

Holliman, R, E., Johnson, J, D. and Savva, D. (1990).

Diagnosis of Cerebral Toxoplasmosis in Association with AIDS Using the Polymerase Chain Reaction.
Scand J. Infect Dis **22** : 243-244.

Howe, D.K. and Sibley, D. (1995)

Toxoplasma gondii comprises three clonal lineages : correlation of parasite genotype with human disease

The J. of Inf. Dis. **172** : 1561-1566

Howe, D.K., Honoré, S., Derouin, F. and Sibley, L.D. (1997).

Determination of genotypes of *Toxoplasma gondii* strains isolated from patients with toxoplasmosis.

Journal of clinical microbiology **35** : 1411-1414.

Hughes, H.P. and Balfour, A.H. (1981).

An investigation of the antigenic structure of *Toxoplasma gondii*.

Parasite Immunol. **3** : 235-248.

Hughes H.P.A. (1988a).

Oxidative killing of intracellular parasites mediated by macrophages.

Parasitol. Today **4** : 340.

Hughes H.P.A., Kasper, L.H., Little, J. and Dubey, J.P. (1988b).

Absence of a role for natural killer cells in the control of acute infection

by *Toxoplasma gondii* oocysts.

Clin. Exp. Immunol. **72** : 394.

Huldt, G. (1960).

Experimental toxoplasmosis : transplacental transmission in guinea-pig.

Acta Path. **42** : 176-188.

Huldt, G. (1971).

Studies on experimental toxoplasmosis.

Ann. N.Y. Acad. Sci. **177** : 146.

Hunter, C.A., Subauste, C.S., et al(1994)

Production of gamma interferon by natural killer cell from *Toxoplasma gondii*-infected SCID mice : regulation by interleukin-10, interleukin-12, and tumor necrosis factor alpha

Infect. and Immun. **62** : 2818-2824

Hunter, C.A., Chizzonite, R., and Remington, J.S (1995a)

Interleukin-1 β is required for the ability of the IL-12 to induce production of IFN- γ by NK cells : a role for IL-1 β in the T cell independent mechanism of resistance against intracellular pathogens

J. Immunol. **155** : 4347-4354

Huskinson, J., Thulliez, P. et al. (1990).

Toxoplasma antigens recognized by human immunoglobulin A antibodies.
J. Clin. Microbiol. **28** : 2632-2636.

Hutchison, W.M., Dunachie, J.F., Siim, J.C. and Work, K. (1970).

Coccidian-like nature of *Toxoplasma gondii*.
Br. Med. J. **1** : 142.

Hutchison, W.M. (1986).

Strain of mouse *Toxoplasma* used in the mouse model of congenital toxoplasmosis at Strathclyde University.
Ann. Trop. Med. Parasitol. **80** : 253-255.

Israelski, D.M., Skowron, G., Leventhal, J.P., Long, I., Blankenship, C.F., Barrio, G.W., Prince, J.B., Araujo, F.G. and Remington, J.S. (1988).

Toxoplasma peritonitis in a patient with acquired immunodeficiency syndrome.
Arch. Intern. Med. **148** : 1655-1657.

Israelski, D. and Remington, J. (1990).

Activity of gamma interferon in combination with pyrimethamine or clindamycin in treatment of murine toxoplasmosis.
Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. **9** : 358-360.

Jacobs, L. (1956).

Propagation, morphology, and biology of *Toxoplasma*.
Ann. N.Y. Acad. Sci. **64** : 154-179.

Jacobs, L. and Lunde, M.N. (1957)

A hemagglutination test for toxoplasmosis.
J. Parasitol. **43** : 308-314.

Jacobs, L., Remington, J.S. and Melton, M.L. (1960a).

The resistance of the encysted form of *Toxoplasma gondii*.
J. Parasitol. **46** : 11.

Jacobs, D., Dubremetz, J.F., Loyens, A., Bosman, F., Saman, E. (1998).

Identification and heterologous expression of a new dense granule protein (GRA7) from *Toxoplasma gondii*.
Molecular and Biochemical Parasitology **91** : 237-249.

James, G.S., Sintchenko, V.G., Dickeson, D.J. and Gilbert G.L. (1996).

Comparison of cell culture, mouse inoculation, and PCR for detection of *Toxoplasma gondii* : effects of storage conditions on sensitivity.
Journal of Clinical Microbiology **34** : 1572-1575.

Janku, J. (1923).

Pathogénèse et anatomie pathologique de la macula dans un oeil de dimension normale et dans un oeil microphthalmalme avec parasite dans la rétine.
Cas. Lek. Cesk. **62** : 1021.

Johnson, A.M. (1985).

The antigenic structure of *Toxoplasma gondii* : A review.
Pathol. 17 : 9-19.

Johnson A , M., Dubey, J.P. and Dame, J , B. (1986a).

Purification and Characterization of *Toxoplasma gondii* Tachyzoite DNA.
Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci., 64 : 351-355.

Johnson, A.M., McDonald, P.J. et al.(1986b).

Characterization and in vitro translation of *Toxoplasma gondii* ribonucleic acid.
Mol. Biochem. Parasitol. 18 : 313-320.

Johnson, A , M., Murray, P , J., Baverstock, S., I. and P. J. (1987a).

Rapid nucleotide sequence analysis of the small subunit ribosomal RNA of *Toxoplasma gondii* :
evolutionary implications for the Apicomplexa.
Molecular and Biochemical Parasitology 25 : 239-246.

Johnson, A.M. and Baverstock P.R. (1989).

Rapid ribosomal RNA sequencing and the phylogenetic analysis of protists.
Parasitol. Today 5 : 102-105.

Johnson, A.M. (1990a).

Comparison of dinucleotide frequency and codon usage in *Toxoplasma* and *Plasmodium* :
evolutionary implications.
J. Mol. Evol. 30 : 383-387.

Johnson, A.M. (1990b).

Toxoplasma : Biology, pathology, immunology and treatment.
Coccidiosis of man and domestic animals.
Boca Raton, Florida, CRC Press. 121-153.

Johnson, A.M. and Illana, S. (1991).

Cloning of *Toxoplasma gondii* gene fragments encoding diagnostic antigens.
Gene 99 : 127-132.

Johnson, A.M., Illana, S. et al. (1989).

Cloning, expression and nucleotide sequence of the gene fragment encoding an antigenic portion of
the nucleoside triphosphate hydrolase of *Toxoplasma gondii*.
Gene 85 : 215-220.

Johnson, L.L. (1992).

SCID mouse models of acute and relapsing chronic *Toxoplasma gondii* infections.
Infect. Immun. 60 : 3719-3724.

Jones, T.C. and Hirsch, J.G. (1972).

The interaction between *Toxoplasma gondii* and mammalian cells. II. The absence of lysosomal
fusion with phagocytic vacuoles containing living parasites.
J. Exp. Med. 136 : 1173-1194.

- Joss, A.W., Chatterton, J.M., Evans, R. and Ho-Yen, D.O.** (1993).
Toxoplasma polymerase chain reaction on experimental blood samples.
J. Med. Microbiol. **38** : 38-43.
- Kapperud, G., Jenum, P.A., Stray-Pedersen, B.S., Melby, K.K., Eskild, A., and Eng, J.** (1996)
Risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in pregnancy
Am. J. Epidemiol. **144** : 405-412
- Kasper, L.H., Crabb, J.H. et al.** (1982).
Isolation and characterization of a monoclonal antibody-resistant antigenic mutant of *Toxoplasma gondii*.
J. Immunol. **129** : 1694-1699.
- Kasper, L.H., Bradley, M.S. and Pfefferkorn, E.R.** (1984).
Identification of stage-specific sporozoite antigens of *Toxoplasma gondii* by monoclonal antibodies.
J. Immunol. **132** : 443.
- Kasper, L.H.** (1987).
Isolation and characterization of a monoclonal anti-P30 antibody resistant mutant of *Toxoplasma gondii*.
Parasite immunol. **9** : 433-445.
- Kasper, L.H.** (1989).
Identification of stage-specific antigens of *Toxoplasma gondii*.
Infect. Immun. **57** : 668.
- Kasper, L.H., Khan, I.A., Ely, K.H., Buelow, R. and Boothroyd, J.C.** (1992).
Antigen-specific (p30) mouse CD8⁺ T cells are cytotoxic against *Toxoplasma gondii*-infected peritoneal macrophages.
J. Immunol. **148** : 1493-1498.
- Katlama, C., Mouthon, B., Gourdon, D., Lapierre, D., Rousseau, F., and the Atovaquone expanded access group**
Atovaquone as long-term suppressive therapy for toxoplasmic encephalitis in patients with AIDS and multiple drug intolerance
AIDS **10** : 1107-1112
- Kaufman, H.E., Melton, M.L. et al.** (1958).
Strain differences of *Toxoplasma gondii*.
J. Parasitol. 189-190.
- Kaufmann, S.H.E., and Kabelitz, D.** (1996)
Gamma/delta T lymphocytes and heat shock proteins
Current Topics in Microbiology and immunology, U, Gross, ed. (Springer, Heidelberg, Germany)
- Kellog, D.E., Sninsky, J.J. and Kwok, S.** (1990).
Quantitation of HIV-1 proviral DNA relative to cellular DNA by the polymerase chain reaction.
Anal Biochem **189** : 202-208.

Kellogg, D.E., Rybalkin, I., Chen, S., Mukhamedova, N., Vlasik, T., Chenchik, A. and Siebert, P.D. (1994).

TaqStart™ : a neutralizing monoclonal antibody that facilitates "hot start" PCR
Clontechniques **9** : 1-23.

Khan, I.A., Smith, K.A. and Kasper, L.H. (1990).

Induction of antigen-specific human cytotoxic T cells by *Toxoplasma gondii*.
J. Clin. Invest. **85** : 1879.

Khuong, M.A., Matheron, S., Marche, C., Truchis, P.D., Coulaud, J.P. and Saimot, A.G. (1990).

Diffuse toxoplasmic encephalitis without abscess in AIDS patients.
 In Program and abstracts of the 30th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, American Society for Microbiology.

Krahenbuhl, J.L., Blazkovec, A.A. and Lysenko, M.G. (1971).

In vivo and in vitro studies of delayed-type hypersensitivity to *Toxoplasma gondii*. in guinea pigs.
Infect. Immun. **3** : 260-267.

Krahenbuhl, J.L., Gaines, J.D. and Remington, J.S. (1972).

Lymphocyte transformation in human toxoplasmosis.
J. Infect. Dis. **125** : 283.

Kuticic, V., and Wikerhauser, T. (1996)

Studies of effect of various treatments on the viability of *Toxoplasma gondii* tissue cysts and oocysts

Current Topics in microbiology and immunology : *Toxoplasma gondii*, U. Gross, ed (Springer, Heidelberg Germany), pp261-265

Kwok, S. and Higuchi, R. (1989).

titre avoiding false positives with PCR.
Nature **339** : 237.

Lainson, R. (1958).

Observations on the development and nature of pseudocysts and cysts of *Toxoplasma gondii*.
Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. **52** : 396.

Landgraf, A., Reckmann, B. and Pingoud, A. (1991).

Quantitative analysis of polymerase chain reaction (PCR) products using primers labeled with biotin and a fluorescent dye.

Analytical Biochemistry **193** : 231-235.

Lebech, M., Lebech, A.M., Nelsing, S., Vuust, J., Mathiesen, L. and Petersen, E. (1992).

Detection of *Toxoplasma gondii* DNA by Polymerase Chain Reaction in cerebrospinal fluid from AIDS patients with Cerebral Toxoplasmosis.

The Journal of Infectious Diseases **165** : 982-983.

Lecordier, L., Mercier, C. et al. (1993).

Molecular structure of a *Toxoplasma gondii* dense granule antigen (GRA5) associated with the parasitophorous vacuole membrane.

Mol. Biochem. Parasitol. **59** : 143-154.

Lecordier, L., Dubremetz, J.F. et al. (1995).

Characterization of a dense granule antigen of *Toxoplasma gondii* (GRA6) associated to the network of the parasitophorous vacuole.

Molecular and Biochemical Parasitology **70** : 85-94.

Le Fichoux, Y., Marty, P., Chan, H. and Doucet, J. (1984).

Détection des IgM antitoxoplasmiques par ISAGA. A propos de 3786 sérologies.

Bull. Soc. Fr. Parasitol. **3** : 15-18.

Leport, C., Raffi, F. and Vilde, J.L. (1988).

Traitement de la toxoplasmose cérébrale au cours du SIDA.

Méd. Mal. Infect. **18** : 729-736.

Leriche, M.A. and Dubremetz J.F. (1990).

Exocytosis of *Toxoplasma gondii* dense granules into the parasitophorous vacuole after host cell invasion.

Parasitol. Res. **76** : 559-562.

Leriche, M.A. and Dubremetz, J.F. (1991).

Characterization of the protein contents of rhoptries and dense granules of *Toxoplasma gondii* tachyzoites by subcellular fractionation and monoclonal antibodies.

Mol. Biochem. Parasitol. **45** : 249-260.

Levine, N.D., Corliss, J.O., Cox, F.E.G., Deroux, G., Grain, J., Honiberg, B.M., Leedale, G.F., Loeblich, A.R., Lom, J., Lynn, D., Merifield, E.G., Page, F.C., Poljansky, G., Sprague, V., Vavra, J. and Wallace, F.G. (1980).

A newly revised classification of the Protozoa.

J. Protozool. **27** : 37-58.

Levy, J.K., Ritchey, J.W., and coll (1998)

Elevated interleukin-10- to-interleukin-12 ratio in feline immunodeficiency virus-infected cats predicts loss of type 1 immunity to *Toxoplasma gondii*

The J. infect. Dis. **178** : 503-511

Li, B., Sehajpal, P. K., Khanna, A., Vlassara, H., Cerami, A., Stenzel, H. and Suthanthiran, M. (1991).

Differential regulation of transforming growth factor β and interleukin 2 genes in human T cells : Demonstration by usage of novel competitor DNA constructs in the quantitative polymerase chain reaction.

J. Exp. Med. **174** : 1259-1262.

Liesenfeld, O., Kang, H., Park, D., Nguyen, T.A., Parkhe, C.V., Watanabe, H., Abo, A., Sher, S., Remington, J.S., Suzuki, Y. (1999)

TNF- α , nitric oxide and IFN- γ are all critical for development of necrosis in the small intestine and early mortality in genetically susceptible mice infected perorally with *Toxoplasma gondii*
Parasite immunol. **21** : 365-376

Lindberg, R.E. and Frenkel, J.K. (1977).

Toxoplasmosis in nude mice.

J. Parasitol. **63** : 219-221.

Linder, E., Thors, C. et al. (1992).

Generation of antibodies against *Toxoplasma gondii* antigen associated with dense granules and the parasitophorous vacuole of the host cell.

Parasitol. Res. **78** : 175-178.

Loke, Y.W. (1982).

Transmission of parasites across the placenta.

Advanc. Parasit. **21** : 155-228.

Luft, B.J., Naot, Y., Araujo, F.G., Stinson, B. and Remington, J.S. (1983).

Primary and reactivated *Toxoplasma* infection in patients with cardiac transplants.

Clinical spectrum and problems in diagnosis in a defined population. Ann. Intern. **99** : 27.

Luft, B.J., Brooks, R.G., Conley, F.K., McCabe, R.E. and Remington, J.S. (1984a).

Toxoplasmic encephalitis in patients with Acquired Immune Deficiency Syndrome.

J. Am. Med. Assoc. **252** : 913.

Luft, B.J., Kansas, G., Engleman, E.G. and Remington J.S. (1984b).

Functional and quantitative alterations in T lymphocyte subpopulations in acute toxoplasmosis.

J. Infect. Dis. **150** : 761.

Luft, B.J. and Remington, J.S. (1988).

AIDS commentary. Toxoplasmic encephalitis.

J. Infect. Dis. **157** : 1-6.

Lundeberg, Joakim., Wahlberg, Johan. and Uhlén, Mathias. (1991).

Rapid colorimetric quantification of PCR-Amplified DNA.

BioTechniques **10** : 68-75.

Luo, W., Aosai, F., Ueda, M., Yamashita, K., Shimizu, K., Sekiya, S. and Yano, A. (1997).

Kinetics in parasite abundance in susceptible and resistant mice infected with an avirulent strain of *Toxoplasma gondii* by using quantitative competitive PCR.

J. Parasitol. **83** : 1070-1074.

Luton, K., Gleeson, M., Johnson, A.M. (1995).

rRNA gene sequence heterogeneity among *Toxoplasma gondii* strains.

Parasitol. Res. **81** : 310-315.

Lycke, E. and Norrby, R. (1966).

Demonstration of a factor of *Toxoplasma gondii* enhancing the penetration of *Toxoplasma* parasites into cultured host-cells.

Brit. J. Exp. Pathol. **47** : 248-256.

Lycke, E., Carlberg, K. et al. (1975).

Interactions between *Toxoplasma gondii* and its host cells : function of the penetration-enhancing factor of *Toxoplasma*.

Infect. Immun. **11** : 853-861.

Makioka, A., Stavros, B., Ellis, J.T. and Johnson, A.M. (1993).

Detection and characterization of DNA polymerase activity in *Toxoplasma gondii*

Parasitology **107** : 135-139

Makioka, A., and Ohtomo, H. (1995)

An increased DNA polymerase activity associated with virulence of *Toxoplasma gondii*

J. Parasitol. **81** : 1021-1022

Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J., (1990)

Molecular cloning : a laboratory manual. Cold Spring harbor Laboratory.

Marx-Chemla, C., Thelliez, E., Foudrinier, F., Aubert, D., Bonhomme, A., Ducasse, A. et Pinon, J.M. (1993).

Toxoplasmose oculaire : mise en évidence de toxoplasmes libres dans l'humeur aqueuse.

La Presse Médicale **22** : 734.

McCabe, R.E., Luft, B.J. and Remington, J.S. (1984).

Effect of murine interferon gamma on murine toxoplasmosis.

J. Infect. Dis. **150** : 961-962.

McCabe, R.E. and Remington, J.S. (1986).

Mechanisms of killing of *Toxoplasma gondii* by rat peritoneal macrophages.

Infect. Immun. **52** : 151-155.

McCabe, R. and Remington, J.S. (1988).

Toxoplasmosis : the time has come (editorial).

N. Engl. J. Med. **318** : 313-315.

McLeod, R., Beem, M.O. and Estes, R.G. (1985).

Lymphocyte anergy specific to *Toxoplasma gondii* antigens in a baby with congenital toxoplasmosis.

J. Clin. Lab. Immunol. **17** : 149-153

McLeod, R., Skamene, E., Brown, C.R., Eisenhauer, P.B., and Mack, D. (1989)

Genetic regulation of early survival and cyst number after peroral *Toxoplasma gondii* infection of AxB / BxA recombinant inbred and B10 congenic mice

The journal of Imm. **143** : 3031-3034

Mercier, C., Lecordier, L. et al. (1993).

Molecular characterization of a dense granule antigen (GRA2) associated with the network of the parasitophorous vacuole in *Toxoplasma gondii*.

Mol. Biochem. Parasitol. **58** : 71-82.

Mercier, C., Lefebvre-Van hende, S., Garber, G.E., Lecordier, L., Capron, A. and Cesbron-Delauw, M.F (1996).

Common *cis*-acting elements critical for the expression of several genes of *Toxoplasma gondii*.

Mol. Microbiology **21** : 421-428

Mercier, C., Howe, D.K., Mordue, D., Lingnau, M. and Sibley, L.D. (1998)

Targeted disruption of the *GRA2* locus in *Toxoplasma gondii* decrease acute virulence in mice

Infection and Immunity **66** : 4176-4182

Mévelec, M.N., Chardès, T. et al. (1992).

Molecular cloning of GRA4, a *Toxoplasma gondii* dense granule protein, recognized by mucosal IgA antibodies.

Mol. Biochem. Parasitol. **56** : 227-238.

Misiura, K., Durrant, I., Evans, M.R. and Gait, M.J. (1990).

Biotinyl and phosphotyrosinyl phosphoramidite derivatives useful in the incorporation of multiple reporter groups on synthetic oligonucleotides.

Nucleic Acids Research **18** : 4345.

Mordue, D.G. and Sibley, L.D. (1997)

Intracellular fate of vacuoles containing *Toxoplasma gondii* is determined at the time of formation and depends on the mechanism of entry

The J. of Parasitol. **159** : 4432-4459

Morlat, P., Ragnaud, J.M., Gin, H., Lacoste, D., Beylot, J et Aubertin, J. (1993).

La toxoplasmose cérébrale au cours du SIDA.

Méd. Mal. Infect. **23 spécial** : 183-189

Murray, H.W., Juangbhanich, C.W., Nathan, C.F. and Cohn, Z.A. (1979).

Macrophage oxygen-dependent antimicrobial activity. II. The role of oxygen intermediates.

J. Exp. Med. **150** : 950.

Murray, H.W., Spitalny, G.L. and Nathan, C.F. (1985a).

Activation of mouse peritoneal macrophages in vitro and in vivo by interferon- γ^1 .

J. Immunol. **134** : 1619.

Murray, H.W., Rubin, B.Y., Carriero, S.M., Harris, A.M. and Jaffe, E.A. (1985b).

Human mononuclear phagocyte antiprotozoal mechanisms : oxygen-dependent vs oxygen-independent activity against intracellular *Toxoplasma gondii*.

J. Immunol. **134** : 1982.

Nagel, S.D. and Boothroyd, J.C. (1988).

The α - and β -tubulins of *Toxoplasma gondii* are encoded by single copy genes containing multiple introns.

Mol. Biochem. Parasitol. **29** : 261-273.

- Nagel, S.D. and Boothroyd, J.C.** (1989)
The major surface antigen, P30 of *Toxoplasma gondii* is anchored by a glycolipid.
J. Biol. Chem. **264** : 5569-5574.
- Nakao, M. and Konishi, E.** (1991a).
Proliferation of *Toxoplasma gondii* in human neutrophils *in vitro*.
Parasitol. **103** : 23.
- Nakao, M. and Konishi, E.** (1991b).
Neutrophil chemotactic factors secreted from *Toxoplasma gondii*.
Parasitol. **103** : 29.
- Nakayama, I.** (1968).
Investigation on the congenital transmission of toxoplasmosis in chronically infected mice which were reinoculated during pregnancy.
Jap. J. Parasit. **17** : 128-138.
- Nakayama, H., Yokoi, H. and Fujita, J.** (1992).
Quantification of mRNA by non-radioactive RT-PCR and CCD imaging system.
Nucleic Acids Research **20** : 4939.
- Nathan, C.F., Murray, H.W., Wiebe, M.E. and Rubin, B.Y.** (1983).
Identification of interferon- γ as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity.
J. Exp. Med. **158** : 670-689.
- Neimark, H. and Blaker, M.G.** (1967).
DNA base composition of *Toxoplasma gondii* grown *in vivo*.
Nature **216** : 600.
- Nichols, B.A., Chiappino, M.L. and O'Connor G.R.** (1983).
Secretion from the rhoptries of *Toxoplasma gondii* during host-cell invasion.
J. Ultrastruct. Res. **83** : 85.
- Nichols, B.A. and Chiappino, M.L.** (1987).
Cytoskeleton of *Toxoplasma gondii*.
J. Protozool **34** : 217.
- Nicolas, J.A. and Pestre-Alexandre, M.** (1993)
Toxoplasmose : Une zoonose transmissible à l'homme
Méd. mal. Infect. **23** : 129-138.
- Nicoll, S., Wright, S., Maley, S.W., Burns, S. and Buxton, D.** (1997).
A mouse model of recrudescence of *Toxoplasma gondii* infection.
J. Med. Microbiol. **46** : 263-266.
- Nicolle, C. et Manceaux, L.** (1908).
Sur une infection à corps de Leishman (ou organismes voisins) du gondi.
Arch. Inst. Pasteur Tunis **1** : 97-103.

Nicolle, C. et Manceaux, L. (1909).
Sur un protozoaire nouveau du gondii.
C.R. Acad. Sci. **148** : 369-371.

Novati, R. Castagna, A., Morsica, G., Vago, L., Tambussi, G., Ghezzi, Silvia., Gervasoni, C., Bisson, C., d'Arminio Monforte, A. and Lazzarin, A. (1994).
Polymerase chain reaction for *Toxoplasma gondii* DNA in the cerebrospinal fluid of AIDS patients with focal brain lesions.
AIDS **8** : 1691-1694.

Nozik, R.A. and O'Connor, G.R. (1970).
Studies on experimental ocular toxoplasmosis in the rabbit. I. The effect of antigenic stimulation.
Arch. Ophthalmol. **83** : 724-728.

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

Ödberg-Ferragut, C., Soête, M., Engels, A., Samy, B., Loyens, A., Van Beeumen, J., Camus, D., Dubremetz, J-F. (1996)
Molecular cloning of the *Toxoplasma gondii* SAG 4 gene encoding an 18 kDa bradyzoite specific surface protein
Mol. and bioch. Par. **82** : 237-244

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

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

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

Paige, B.H., Cowen, D. and Wolf, A. (1939).
Am. J. Dis. Child. **63** : 474-481.

Pannetier C., Delassus, S., Darche, S., Saucier, C. and Kourilsky, P.(1993)
Quantitative titration of nucleic acids by enzymatic amplification reactions run to saturation.
Nucleic Acids Research **21** : 577-83.

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

- Parmley, St. F., Goebel, Fr , D. and Remington, J , S. (1992).**
Detection of *Toxoplasma gondii* in cerebrospinal fluid from AIDS patients by Polymerase Chain Reaction.
Journal of Clinical Microbiology **30** : 3000-3002.
- Parmley, S.F., Sgarlato, G.D. et al. (1993).**
Genomic and corrected cDNA sequence of the P28 gene from *Toxoplasma gondii* .
Mol. Biochem. Parasitol. **57** : 161-166.
- Parmley, S.F., Yang, S., 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** : 283-296.
- Parmley, S.F., Weiss, L.M., Yang, S. (1995).**
Cloning of a bradyzoite-specific gene of *Toxoplasma gondii* encoding a cytoplasmic antigen.
Molecular and Biochemical Parasitology **73** : 253-257.
- Partanen, P., Turunen, H.J. et al. (1984).**
Immunoblot analysis of *Toxoplasma gondii* antigens by human immunoglobulins G, M and A antibodies at different stages of infection.
J. Clin. Microbiol. **20** : 133-135.
- Pavesio C.E.N., Chiappino, M.L., Setzer, P.Y. and Nichols, B.A. (1992).**
Toxoplasma gondii : differentiation and death of bradyzoites.
Parasitol. Res. **78** : 1.
- Pavia, C.S. (1986).**
Protection against experimental toxoplasmosis by adoptive immunotherapy.
J. Immunol. **137** : 2985.
- Pavia, C.S. (1987).**
Thymocyte-dependent immunity to toxoplasmosis in the normal and immunocompromised guinea-pig host.
Parasite Immunol. **9** : 205-218.
- Peccoud. J. (1993).**
La PCR quantitative : un nouvel outil pour l'analyse médicale.
Médecine Sciences **9** : 1378-1385.
- Pelloux, H., Picot, S. et Ambroise-Thomas, P. (1993).**
Biologie moléculaire : hybridation et amplification de gènes en parasitologie.
Revue française des laboratoires **253** : 75-80.
- Pelloux, H., Dupouy-Camet, J., Derouin, F., Aboulker, J.P., Raffi, F. and the Bio-Toxo Study Group. (1997).**
A multicentre prospective study for the polymerase chain reaction detection of *Toxoplasma gondii* DNA in blood samples from 186 AIDS patients with suspected toxoplasmic encephalitis.
AIDS **11** : 1888-1890.

Pelloux, H., Guy, E., Angelici, M.C., Aspöck, H., Bessières, M.H., Blatz, R., Del Pezzo, M., Girault, V., Gratzl, R., Holberg-Petersen, M., Johnson, J., Krüger, D., Lappalainen, M., Naessens, A. and Olsson, M. (1998).

A second European collaborative study on polymerase chain reaction for *Toxoplasma gondii* involving 15 teams.

FEMS Microbiology Letters **165** : 231-237.

Perrin, S. and Gilliland, G. (1990).

Site-specific mutagenesis using asymmetric polymerase chain reaction and a single mutant primer. Nucleic Acids Research **18** : 7433.

Peters, S.E., Wakefield, A.E., Banerji, S. and Hopkin, J.M. (1992).

Quantification of the detection of *pneumocystis carinii* by DNA amplification.

Mol. Cell Probes **6** : 115-117.

Pfefferkorn, E.R. and Pfefferkorn, L.C. (1976).

Toxoplasma gondii : isolation and preliminary characterization of temperature-sensitive mutants. Exp. Parasitol. **39** : 365-376.

Pfefferkorn, E.R. and Pfefferkorn, L.C. (1977).

Specific labeling of intracellular *Toxoplasma gondii* with uracil.

J. Protozool. **24** : 449-453.

Pfefferkorn, E.R., Eckel, M. and Rebhun, S. (1986).

Interferon- γ suppresses the growth of *Toxoplasma gondii* in human fibroblasts through starvation for tryptophan.

Mol. Biochem. Parasitol. **20** : 215-224.

Pfefferkorn, E.R., Eckel, M.E. et al. (1989).

Toxoplasma gondii : the biochemical basis of resistance to Emimycin.

Exp. Parasitol. **69** : 129-139.

Pfefferkorn, E.R. (1990).

Cell biology of *Toxoplasma gondii*. Modern parasite biology : cellular immunological and molecular aspects.

Freeman. New York 26-50.

Pfefferkorn, E.R., Borotz, S.E. et al. (1992).

Toxoplasma gondii : characterization of a mutant resistant to sulfonamides.

Exp. Parasitol. **74** : 261-270.

Philippe F., Lepetit, D., Grancher, M.F., Morel, A. et Henocq A. (1988).

Pourquoi surveiller les enfants dont les mères ont eu une séroconversion de toxoplasmose pendant la grossesse ?

Ann. Pédiatr. (Paris) **35** : 5-10.

Phillips, S.M., Bentley, A.G., Linette, G., Doughty, B.L. and Capron, M. (1983).

The immunologic response of congenitally athymic rats to *Schistosoma mansoni* infection. I. In vivo studies of resistance.

J. Immunol. **131** : 1466-1474.

Piatak, M., Saag, M.S. and Yang, L.C. (1993).

High levels of HIV-1 in plasma during all stages of infection determined by competitive PCR.
Science **259** : 1749-1754.

Pinon, J.M., Thoannes, H. and Gruson, N. (1985).

An enzyme-linked immuno-filtration Assay used to compare infant and maternal antibody profiles in toxoplasmosis.

J. Immunol. Meth. **77** : 15-23.

Pinon, J.M., Poirriez, J., Leroux, B., Dupouy, D., Quereux, C. et Garin, J.P. (1987).

Diagnostic précoce et surveillance de la toxoplasmose congénitale. Méthode des profils immunologiques comparés.

Presse Med. **16** : 471-474.

Pinon, J.M., Toubas, D. et al. (1990).

Detection of specific immunoglobulin E in patients with toxoplasmosis.

J. Clin. Microbiol. **28** : 1739-1743.

Porchet-Henneré, E. et Torpier, G. (1983).

Relations entre *Toxoplasma* et sa cellule-hôte.

Protistologica **3** : 357.

Porcher, C., Malinge, M.C., Picat, C. and Grandchamp, B. (1992).

A simplified method for determination of specific DNA or RNA copy number using quantitative PCR and an automatic DNA sequencer.

Biotechniques **13** : 106-114.

Potasman, L., Araujo, F.G., Desmonts, G. and Remington, J.S. (1986).

Analysis of *Toxoplasma gondii* antigens recognized by human sera obtained before and after acute infection.

J. Infect. Dis. **154** : 650-657.

Prescott., Harley et Klein (1995).

Microbiologie.

Ed : DeBoeck Université : 590-591.

Prince, J.B., Koven-Quinn, M.A. et al. (1985).

Cell free synthesis of *Toxoplasma gondii* antigens.

Mol. Biochem. Parasitol. **17** : 163-170.

Prince, J.B., Araujo et al; (1989)

Cloning of cDNAs encoding a 28 kilodalton antigen of *Toxoplasma gondii*

Mol. Biochem. Parasitol. **34** : 3-13

Prince, J.B., Auer, K.L. et al. (1990).

Cloning, expression, and cDNA sequence of surface antigen P22 from *Toxoplasma gondii*.

Mol. Biochem. Parasitol. **43** : 97-106.

Pujol, M., Morel, B. et Malbruny, B. (1989).

Intérêt de la recherche des IgA dans le diagnostic de la toxoplasmose.

Path. Biol. **37** : 893.

Pujol, M., Malbruny, B., Morel, C. et Exmelin, L. (1992).

Rappel de l'importance du suivi sérologique des enfants suspects de toxoplasmose congénitale.

Path. Biol. **40** : 238-241.

Pyc, L., Mangan, J., Holliman, R.E., Butcher, P.D. (1999)

Quantitation of *Toxoplasma gondii* DNA in a competitive nested polymerase chain reaction

J. Clin. Pathol. **52** : 61-64

Rabjeau, A., Foussard, F., Mauras, G. and Dubremetz, J.F. (1997).

Enrichment and biochemical characterization of *Toxoplasma gondii* tachyzoite plasmalemma.

Parasitology **114** : 421-426.

Rahmah, N. and Khairul Anuar, A. (1992).

Demonstration of antigenic similarities and variations in excretory/secretory antigens of *Toxoplasma gondii*.

Biochem. Biophys. Res. Comm. **187** : 294-298.

Remington, J.S. and Cavanaugh, E.N. (1965).

Isolation of the encysted form of *Toxoplasma gondii* from human skeletal muscle and brain.

New Engl. J. Med. **273** : 1308.

Remington, J.S., Miller, M.J. and Brownlee, I. (1968).

IgM antibodies in acute toxoplasmosis. II. Prevalence and significance in acquired cases.

J. Lab. Clin. Med. **71** : 855-859.

Remington, J.S. Bloomfield, M.M. et al. (1970).

The RNA of *Toxoplasma gondii*.

PSEBM **133** : 623-626.

Remington, J.S. (1982).

Toxoplasmosis in homosexuals.

Lyon. Med. **284 (hors série)** : 133-134.

Remington J.S. and Krahenbuhl J.L. (1982).

Immunology of *Toxoplasma gondii*

in. Comprehensive immunology (A.J. Nahmias and J.R. O'Reilly, eds) pp 327-371. Plenum

Publishing Company, New York

Revol, L. et al. (1964).

Toxoplasmose ganglionnaire acquise et mononucléose infectieuse.

J. Méd. Lyon. **1054** : 901.

Reynolds, E.S., Walls, K.W. and Pfeiffer, R.I. (1966).

Generalized toxoplasmosis following renal transplantation. Report of a case.

Arch. Intern. Med. **118** : 401-405.

- Ridel, P.R., Auriault, C., Darcy, F., Pierce, R., Leite, P., Santoro, F., Neyrinck, J.L. Kusnierz, J.P. and Capron, A. (1988).**
Protective role of IgE in immunocompromized rat toxoplasmosis.
J. Immunol. **141** : 978-983.
- Rodriguez, J.C., Martinez, M.M., Martinez, A.R. and Royo, G. (1997).**
Evaluation of different techniques in the diagnosis of *Toxoplasma* encephalitis.
J. Med. Microbiol. **46** : 597-601.
- Roos, D.S. (1993).**
Primary structure of the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene from *Toxoplasma gondii*.
J. Biol. Chem. **268** : 6269-6280.
- Rougier, D. and Ambroise, T.P. (1985).**
Detection of toxoplasmic immunity by multipuncture skin test with excretory-secretory antigen.
The Lancet **2** : 121-123.
- Saavedra, R., De Meuter, F. et al. (1991).**
Human T cell clone identifies a potentially protective 54 kDa protein antigen of *Toxoplasma gondii* cloned and expressed in *Escherichia coli*.
J. Immunol. **147** : 1975-1982.
- Sabin, A.B. (1941).**
Toxoplasmic encephalitis in children.
J. Am. Med. Assoc. **116** : 801-807.
- Sabin, A.B. (1942).**
Toxoplasmosis, a recently recognized disease of human beings.
Adv. Pédiatr. **1** : 1.
- Sabin, A.B. and Feldman H.A. (1948).**
Dyes as microchemical indicators of a new immunity phenomenon affecting a protozoan parasite (*Toxoplasma*).
Science **108** : 660-663.
- Sadak, A., Taghy, Z., Fortier, B. and Dubremetz, J.F. (1988).**
Characterization of a family of rhoptry proteins of *Toxoplasma gondii*.
Mol. Biochem. Parasitol. **29** : 203-211.
- Sahm, M., Grob, U., Reiter-Owona, I. and Seitz, H.M. (1998).**
Infection and stage conversion during murine pulmonary toxoplasmosis : a study with three different strains of *Toxoplasma gondii*.
J. Parasitol **84** : 723-729.
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A. and Arnheim, N. (1985).**
Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia.
Science **230** : 1350-1354.

Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. and Erlich, H.A. (1988).

Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase.
Science **239** : 487-493.

Saffer, L.D., Long, K.S. et al. (1989).

The role of phospholipase in host cell penetration by *Toxoplasma gondii*.
Am. J. Trop. Med. Hyg. **40** : 145-149.

Saffer, L.D. and Schwartzman, J.D. (1991).

A soluble phospholipase of *Toxoplasma gondii* associated with host cell penetration.
J. Protozool. **38** : 454-460.

Saffer, L.D., Mercereau-Puijalon, O. et al. (1992).

Localization of *Toxoplasma gondii* rhoptry protein by immunoelectron microscopy during and after host cell penetration.
J. Protozool. **39** : 526-530.

Sanger, D., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977)

DNA sequencing with chain-terminating inhibitors
Proc. Nat. Acad. sci. USA **74** : 5463

Santoro, F., Afchain, D., Pierce, R., Cesbron, J.Y., Ovlaque, G. and Capron, A. (1985).

Serodiagnosis of *toxoplasma* infection using a purified parasite protein (P30).
Clin. Exp. Immunol. **62** : 262-269.

Santoro, F., Auriault, C., Leite, P., Darcy, F. et Capron, A. (1987).

Infection du rat athymique par *Toxoplasma gondii*.
C.R. Acad. Sc. Paris. **11** : 297.

Sarciron, M.E., Walchshofer, N., Paris, J., Petavy, A.F. and Peyron, F. (1998).

Phenylalanine derivatives active against *Toxoplasma gondii* brain cysts in mice.
Parasite **5** : 359-364.

Saylas, P.C., Rakhmievich, A.L., Johnson, L.L. (1995)

$\gamma\delta$ T cells and acute primary *Toxoplasma gondii* infection in mice
The J. of inf. dis. **171** : 249-252

Savva, D., Morris, J.C., Johnson, J.D. and Holliman, R.E. (1990).

Polymerase Chain Reaction for Detection of *Toxoplasma gondii*.
J. Med. Microbiol. **32** : 25-31.

Savva, D. and Holliman, R.E. (1991).

PCR to detect toxoplasma.
The Lancet **336** : 1325.

Schartonkersten, T. (1995)

Role of IL12 in induction of cell-mediated immunity to *Toxoplasma gondii*
Reply Res. Immunol. **146** : 545

Schlegel M. (1991).

Protist Evolution and Phylogeny as Discerned from Small Subunit Ribosomal RNA Sequence Comparisons.

Europ. J. Protistol **27** : 207-219.

Schlüter, D., Kaefer, N., Hof, H., Wiestler, O.D. and Deckert-Schlüter, M. (1997).

Expression pattern and cellular origin of cytokines in the normal and *Toxoplasma gondii* infected murine brain.

American Journal of Pathology **150** : 1021-1035.

Schmitz, J.L., Carlin, J.M., Borden, E.C. and Byrne, G.I. (1989).

Beta interferon inhibits *Toxoplasma gondii* growth in human monocyte-derived macrophages.

Infect. Immun. **57** : 3254-3256.

Schoondermark-Van de Ven, E., Galama, J., Kraaijeveld, C., Van Druten, J., Meuwissen, J. and Melchers, W. (1993).

Value of the Polymerase Chain Reaction for the Detection of *Toxoplasma gondii* in cerebrospinal fluid from patients with AIDS.

Clinical Infectious Diseases **16** : 661-666.

Schwarz, R.T. and Tomavo, S. (1993).

The current status of the glycobiology of *Toxoplasma gondii* : glycosylphosphatidylinositols, N- and O-linked glycans, in "48th forum in immunology".

Res. Immunol. **144** : 24-31.

Schwartzman, J.D. and Krug, E.C. (1989).

Toxoplasma gondii characterization of monoclonal antibodies that recognize rhoptries.

Exp. Parasitol. **68** : 74-82.

Seguela, P.J., Bessières, M.H., Foisy, C., Launais, B., Pozet, S., Recco, P. et Linas, M.D. (1976).

Application de la réaction d'hémagglutination indirecte au sérodiagnostic de la toxoplasmose. Utilisation d'un antigène soluble.

Méd. Mal. Infect. **6** : 268.

Sethi, K.K., Endo, T. et al. (1981).

Toxoplasma gondii trophozoites precoated with specific monoclonal antibodies cannot survive within normal murine macrophages.

Immunol. Letters **2** : 343-346.

Sharma, S.D., Hofflin, J.M., and Remington, J.S. (1985).

In vivo recombinant interleukin 2 administration enhances survival against a lethal challenge with *Toxoplasma gondii*.

J. Immunol. **135** : 4160-4163.

Sheffield, H.G. and Melton, M.L. (1969).

Toxoplasma gondii : transmission through feces in absence of toxocara cati eggs.

Science **164** : 431.

- Sheffield, H.G. and Melton, M.L.** (1970).
Toxoplasma gondii : the oocyst, sporozoite, and infection of cultured cells.
Science **167** : 892.
- Sibley, L.D., Weidner, E. and Krahenbuhl, J.L.** (1985a).
Phagosome acidification blocked by intracellular *Toxoplasma gondii*.
Nature **315** : 416-419.
- Sibley, L.D., Krahenbuhl, J.L. and Weidner, E.** (1985b).
Lymphokine activation of J774G8 cells and mouse peritoneal macrophages challenged with *Toxoplasma gondii*.
Infect. Immun. **49** : 760-764.
- Sibley, L.D. and Sharma, S.D.** (1987).
Ultrastructural localization of an intracellular *Toxoplasma* protein that induces protection in mice.
Infect. Immun. **55** : 2137-3141.
- Sibley, L.D. and Krahenbuhl, J.L.** (1988).
Modification of host cell phagosomes by *Toxoplasma gondii* involves redistribution of surface proteins and secretion of a 32 kDa protein.
Eur. J. Cell Biol. **47** : 81-87.
- Sibley, L.D., Pfefferkorn, E.R. et al.** (1991).
Proposal for a uniform genetic nomenclature in *Toxoplasma gondii*.
Parasitol. Today **7** : 327-328.
- Sibley, L.D. and Boothroyd, J.C.** (1992a).
Construction of a molecular karyotype for *Toxoplasma gondii*. isolates.
Mol. Biochem. Parasitol. **51** : 291-300.
- Sibley, L.D. and Boothroyd, J.C.** (1992b).
Calcium-regulated secretion and modification of host cell endocytic compartments by *Toxoplasma*.
Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology, Keystone, USA. *J. Cell. Biochem.* **16A** : 148.
- Sibley, L.D. and Boothroyd, J.C.** (1992c).
Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage.
Nature **359** : 82-85.
- Sibley, L.D., Pfefferkorn, E.R. and Boothroyd, J.C.** (1993).
Development of genetic systems for *Toxoplasma gondii*.
Parasitology Today **9** : 392-395.
- Sibley, L.D., and Howe, D.K.** (1996)
Genetic basis of pathogenicity in toxoplasmosis.
Current Topics in Microbiology and Immunology, U. Gross, Ed (Springer, Heidelberg, Germany. Pp3-16)

Sims, T.A., Hay, J. and Talbot, I.C. (1988).

Host parasite relationship in the brains of mice with congenital toxoplasmosis.

J. Pathol. **156** : 255.

Skorich, D.N., Chiappino, M.L. and Nichols, B.A. (1988).

Invasion of the guinea pig conjunctiva by *Toxoplasma gondii*.

Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. **29** : 1871-1880.

Splendore, A. (1909).

Sur un nouveau protozoaire parasite du lapin. Deuxième note préliminaire.

Bull. Soc. Path. Exot. **2** : 462-465.

Suggs, M., Walls, K.W. and Kagan, L.G. (1968).

Comparative antigenic study of *Besnoitia jellisoni*, *B. panamensis*, and five *Toxoplasma gondii* isolates.

The J. Immunol. **101** : 166-175.

Suzuki, Y. and Remington, J.S. (1988).

Dual regulation of resistance against *Toxoplasma gondii* infection by lyt-2+ and lyt-1+, L3T4+ T cells in mice.

J. Immunol. **140** : 3943-3946.

Suzuki, Y., Orellana, M.A., Schreiber, R.D. and Remington J.S. (1988a).

Interferon- γ : the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*.

Science **240** : 516-518.

Suzuki, Y., Conley, F.K. and Remington, J.S. (1988b).

Differences in virulence and development of encephalitis during chronic infection vary with the strain of *Toxoplasma gondii*.

J. Infect. Dis. **159** : 790-794.

Suzuki, Y., Conley, F.K. and Remington J.S. (1989).

Importance of endogenous IFN-gamma for prevention of toxoplasmic encephalitis in mice.

J. Immunol. **143** : 2045-2050.

Suzuki, Y., Conley, F.K. and Remington, J.S. (1989a).

Differences in virulence and development of encephalitis during chronic infection vary with the strain of *Toxoplasma gondii*.

J. Infect. Dis. **159** : 790-794.

Suzuki, Y. and Kobayashi, A. (1990).

Induction of tolerance to *Toxoplasma gondii* in newborn mice by maternal antibody.

Parasitol, Res. **76** : 424-427.

Suzuki Y. and Remington, J.S. (1990).

The effect of anti IFN- γ antibody on the protective effect of lyt-2+ immune T cells against toxoplasmosis in mice.

J. Immunol. **144** : 1954-1956.

- Suzuki, Y., Joh, K., Orellana, M.A., Conley, F.K. and Remington, J.S. (1991).**
A gene(s) within the H-2D region determines the development of toxoplasmic encephalitis in mice.
Immunol. **74** : 732-739.
- 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".
Res. Immunol. **144** : 66-67.
- Suzuki, Y., Rani, S., and coll (1997)**
Impaired resistance to the developpment of toxoplasmic encephalitis in interleukin-6-deficient mice
Inf. and Imm. **65** : 2339-2345
- Syvänen, A.C., Bengtström, M., Tenhunen, J. and Söderlund, H. (1988).**
Quantification of polymerase chain reaction products by affinity-based hybrid collection.
Nucleic Acids Res **16** : 11327-11338.
- Thardin, J.F. M'Rini, C. et al. (1993).**
Eicosanoid production by mouse peritoneal macrophages during *Toxoplasma gondii* penetration : role of parasite and host cell phospholipases.
Infect. Immun. **61** : 1432-1441.
- Tibayrenc, M. (1993).**
Entamoeba, Giardia and *Toxoplasma* : clones or cryptic species ?
Parasitol. Today **9** : 102-105.
- Tomavo, S., Schwarz, R.T. et al. (1989).**
Evidence for glycosyl-phosphatidylinositol anchoring of *Toxoplasma gondii* major surface antigens.
Mol. Cell. Biol. **9** : 4576-4580.
- Tomavo, S., Fortier, B., Soete, M., Ansel, C., Camus, D. and Dubremetz, J.F. (1991).**
Characterization of bradyzoite specific stage antigens of *Toxoplasma gondii*.
Infect. Immun. **59** : 3750.
- Tomavo, S. (1996)**
The major surface proteins of *Toxoplasma gondii* : structures and functions
Current Topics in Microbiology and immunology : Toxoplasma gondii U. Gross, ed (Springer, Heidelberg Germany)
- Torpiér, G., Charif, H., Darcy, F., Liu, J., Darde, M.L. and Capron, A. (1993).**
Toxoplasma gondii : differential location of antigens secreted from encysted bradyzoites.
Exp. Parasitol. **77** : 13-22.
- Uhlikova, M. and Hubner, J. (1973).**
Congenital transmission of toxoplasmosis in domestic rabbits.
Folia Parasit. Praha. **20** : 285-291.

- Van de Ven, E., Melchers, W., Galama, J., Camps, W. and Meuwissen, J. (1991).**
Identification of *Toxoplasma gondii* Infections by BI Gene Amplification.
Journal of Clinical Microbiology **29** : 2120-2124.
- Verbraak, F.D., Galema, M., Hans van den Horn, G., Bruinenberg, M., Luyendijk, L., Danner, S.A. and Kijlstra, A. (1996).**
Serological and polymerase chain reaction-based analysis of aqueous humour samples in patients with AIDS and necrotizing retinitis.
AIDS **10** : 1091-1099.
- Vilaseca, J., Arnau, J.M., Bacardi, R., Mieras, C., Serrano, A. and Navarro, C. (1982).**
Kaposi's sarcoma and *Toxoplasma gondii* brain abscess in a Spanish homosexual (letter).
Lancet. **1** : 572.
- Vivier, E. et Petitprez, D.E. (1969).**
Le complexe membranaire superficiel et son évolution lors de l'élaboration des individus-fils chez *Toxoplasma gondii*.
J. Cell Biol. **43** : 329.
- Vollmer, T.L., Waldor, M.K., Steinman, L. and Conley, F.K. (1987).**
Depletion of T-4⁺ lymphocytes with monoclonal antibody reactivates toxoplasmosis in the central nervous system : a model of superinfection in AIDS.
J. Immunol. **138** : 3737-3741.
- Walton, B.C., Benchoff, B.M. and Brooks, W.H. (1966).**
Comparison of the indirect fluorescent antibody ytest methylene blue dye test for detection of antibodies to *Toxoplasma gondii*.
Am. J. Trop. Med. **149** : 152-158.
- Wan, K.L., Blackwell, J.M., Ajioka, J.W. (1996)**
Toxoplasma gondii expressed sequence tags : insight into tachyzoite gene expression
Mol. and Bioch. Par. **75** : 179-186
- Wang, A. M., Doyle, M. V. and Mark, D. F. (1989).**
Quantitation of mRNA by the polymerase chain reaction.
Proc. Natl. Acad. Sic. USA **86** : 9717-9721.
- Ware, P.L. and Kasper, L.H. (1987).**
Strain-specific antigens of *Toxoplasma gondii*.
Infect. Immun. **55** : 778-783.
- Warren, W., Wheat, T. and Knudsen, P. (1991).**
Rapid analysis and quantitation of PCR products by high-performance liquid chromatography.
Biotechniques **11** : 250-255.
- Wastling, J.M., Nicoll, S. and Buxton, D. (1993).**
Comparison of two gene amplification methods for the detection of *Toxoplasma gondii* in experimentally infected sheep.
J. Med. Microbiol. **38** : 360-365.

Weber, J.L. (1987).

Analysis of sequences from the extremely A + T - rich genome of *Plasmodium falciparum*.
Gene **52** : 103-109.

Weinman, D. (1943).

Chronic toxoplasmosis.
J. Infect. Dis. **73** : 85-92.

Weiss, L.M., Udem, S.A., Salgo, M., Tanowitz, H.B. and Wittner, M. (1991).

Sensitive and specific detection of toxoplasma DNA in an experimental murine model : use of *Toxoplasma gondii* specific cDNA and the polymerase chain reaction.
The journal of infectious diseases **163** : 180-186.

Weiss, L.M., Chen, Y.Y., Berry, G.J., Strickler, J.G., Dorfman, R.F., Path, F. and Warnke, R.A. (1992).

Infrequent detection of *Toxoplasma gondii* genome in toxoplasmic lymphadenitis.
Hum Pathol. **23** : 154-158.

Weiss, L.M., Ma, Y.F., Takvorian, P.M., Tanoowitz, H.B. and Wittner, M. (1998).

Bradyzoite development in *Toxoplasma gondii* and the hsp70 stress response.
Infection and Immunity **66** : 3295-3302.

Werk, R., Dunker, R. et al. (1984).

Polycationic polypeptides : a possible model for the penetration-enhancing factor in the invasion of host cells by *Toxoplasma gondii*.
J. Gen. Microbiol. **130** : 927-933.

Westblom, T.U. and Belshe, R.B. (1988).

Clindamycin therapy of cerebral toxoplasmosis in an AIDS patient.
Scand. J. Infect. Dis. **20** : 561.

Wilson, C.B., Tsai, V. and Remington, J.S. (1980).

Failure to trigger the oxidative metabolic burst by normal macrophages : possible mechanism for survival of intracellular pathogens.
J. Exp. Med. **151** : 328-346.

Wilson, C.B. and Westall, J. (1985).

Activation of neonatal and adult human macrophages by alpha, beta, and gamma interferons.
Infect. Immun. **49** : 351-356.

Wilson, R.J.M., and Williamson, D.H. (1997)

Extrachromosomal DNA in the apicomplexa
Microb. and Mol. Bio. Re. **61** : 1-16

Woodman, J.P., Dimier, I.H. and Bout, D.T. (1991).

Human endothelial cells are activated by IFN- γ to inhibit *Toxoplasma gondii* replication.
J. Immunol. **147** : 2019-2023.

Wolf, and Cowen. (1937).

A new protozoan disease of man,
Bull. Neurol. Inst. N.Y. **6** : 306.

Wolf, A., Cowen, D. and Paige, B.H. (1939a).

Human toxoplasmosis ; occurrence in infants as an encephalomyelitis, verification by transmission to animals.

Science **89** : 226-230

Wolf, A., Cowen, D. and Paige, M.D. (1939b).

Toxoplasmic encephalomyelitis. 3. a new case granulomatous encephalomyelitis due to a protozoan.

Am. J. Pathol. **15** : 657-694.

Wong, S.Y., Hajdu, M.P. et al. (1993).

Role of specific IgE in diagnosis of acute *Toxoplasma* infection and toxoplasmosis.

J. Clin. Microbiol. **31** : 2952-2959.

Work, K. and Hutchison, W.M. (1969).

A new cystic form of *Toxoplasma gondii*.

Acta Pathol. Microbiol. Scand. **75** : 191-192.

Wright, I. (1972).

Transmission of *Toxoplasma gondii* across the guinea-pig placenta.

Lab. Anim. **6** : 169-180.

Xia, A.D., Gu, Y.Z., Xu, S.J., Wang, K.M., Yang, H.Z., Xu, K.J., Qian, Z.L. and Chen, S.S. (1992).

Construction of a genomic DNA library of the *Toxoplasma gondii* ZS₂ strain screening of specific clones, and DNA diagnosis of toxoplasmosis.

Am. J. Trop. Med. Hyg. **46** (1) :50-56.

Yang, S., Parmley, S.F. (1995).

A bradyzoite stage-specifically expressed gene of *Toxoplasma gondii* encodes a polypeptide homologous to lactate dehydrogenase.

Molecular and Biochemical Parasitology **73** : 291-294.

Yong, E.C., Chi, E.Y., Fritsche, T.R. and Henderson, W.R. (1991).

Human platelet-mediated cytotoxicity against *Toxoplasma gondii* : role of thromboxane.

J. Exp. Med. **173** : 65-78.

Zaks-Zilberman, M., Salkowski, C.A., Elsasser, T., Cuttitta, F., and Vogel, S.N. (1998)

Induction of adrenomedullin mRNA and protein by lipopolysaccharide and paclitaxel (taxol) in murine macrophages

Inf. and Imm. **66** : 4669-4675

Zenner, L., Darcy, F., Cesbron-Delauw, M.F. et Capron, A. (1991).

Un nouveau modèle de toxoplasmose congénitale chez le rat.

Société Française de Parasitologie 13-14 décembre 1991, Orléans, France.

Zenner, L., Darcy, F., Cesbron-Delauw, M.F. and Capron, A. (1993).

Rat model of congenital toxoplasmosis : rate of transmission of three *Toxoplasma gondii* strains to fetuses and protective effect of a chronic infection.

Infection and Immunity 61 : 360-363.

Zenner, L., Darcy, F., Capron, A. and Cesbron-Delauw, M.F. (1998).

Toxoplasma gondii : kinetics of the dissemination in the host tissues during the acute phase of infection of mice and rats.

Experimental Parasitology 90 : 86-94.

Zenner, L., Foulet, A., Caudrelier, Y., Darcy, F., Gosselin, B., Capron, A and Cesbron-Delauw, M.F (1999)

Infection with *Toxoplasma gondii* RH and Prugniaud strains in mice, rats and nude rats : kinetics of infection in blood and tissues related to pathology in acute and chronic infection.

Pathol. Res. Pract. 195 : 475-85

