

UNIVERSITE DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE

U.F.R de MEDECINE

Année 2005

THESE

Présentée en vue de l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE REIMS

CHAMPAGNE-ARDENNE

Spécialité : Immunologie et Biologie Parasitaire

Soutenue publiquement le 28 septembre 2005

par

Maggy MARLE-PLISTAT

Née le 29 mai 1977 à Reims

***Toxoplasma gondii* : Réponse immune vis à vis de peptides
de SAG1.**

Membres du Jury

Pr. Hervé Pelloux

Président

Pr. Ermanno Candolfi

Rapporteur

Pr. Isabelle Villena

Examineur

Pr. Sophie Gangloff

Examineur

Dr. Dominique Aubert

Directeur de Thèse

Dr. Richard Le Naour

Directeur de Thèse

Monsieur le Docteur Aubert,

Vous m'avez accueillie et fait confiance depuis mon DEA. Vous m'avez conseillée, soutenue et encouragée dans cette épreuve, veuillez trouver ici le témoignage de ma profonde reconnaissance et ma sincère amitié.

Monsieur le Docteur Le Naour,

Vous m'avez accueillie et encadrée. Soyez remercié pour vos précieux conseils et vos corrections.

Monsieur le Professeur Pelloux,

Vous me faites l'honneur d'être rapporteur de cette thèse et d'en accepter la présidence. Je vous remercie d'avoir accepté de la juger et vous exprime ma reconnaissance.

Monsieur le Professeur Candolfi,

Vous me faites l'honneur d'être rapporteur de cette thèse. Je vous remercie d'avoir accepté de la juger et vous exprime ma reconnaissance.

Madame le Professeur Villena,

Vous me faites l'honneur de juger cette thèse. Soyez remerciée pour vos nombreux et fructueux conseils tout au long de ce travail, votre patience et votre esprit critique. Je vous remercie d'avoir accepté de siéger à ce jury et vous exprime ma sincère amitié.

Madame le Professeur Gangloff,

Vous me faites l'honneur de juger cette thèse. Veuillez trouver ici l'expression de ma sincère reconnaissance.

Monsieur le Professeur Pinon,

Pour m'avoir fait l'honneur de m'accueillir dans son laboratoire, pour ses encouragements et ses conseils avisés, veuillez trouver ici l'expression de ma gratitude.

Monsieur le Professeur Guenounou,

Pour m'avoir fait l'honneur de m'accueillir dans son laboratoire et pour sa confiance, veuillez trouver ici l'expression de ma reconnaissance.

Je remercie le **Pr. P. Nguyen** et **toute son équipe** pour m'avoir fournie les monocytes et lymphocytes élutés.

Je remercie le **Dr. P.Gomis** pour sa disponibilité et pour avoir assuré la partie statistique de ces travaux.

Je remercie l'ensemble des techniciens et membres du laboratoire de parasitologie, particulièrement **Eric Pisano, Naïma Ortis, Francine Marnef et Pascale Lemaire**, pour leur gentillesse, accueil et disponibilité.

Je remercie particulièrement **Régine Geers**, son aide a été précieuse tout au long de cette thèse, qu'elle trouve ici le témoignage de ma profonde estime et de ma reconnaissance.

Je remercie **Virginie Sauvage** avec qui j'ai eu beaucoup de plaisir à travailler.

A mes collègues et amies, **Annelise Gimenez-Maitre, Nathalie Godin et Mélanie Vittier**, qui m'ont supportée durant ces années! Merci pour vos conseils et encouragements les filles!

à mon tendre époux, Mickaël,

à ma maman,

à ma famille,

à mes amis.

Soyez remerciés de votre soutien et de votre patience...

Avec toute mon affection.

Sommaire

INTRODUCTION

I. Préambule	1
II. <i>Toxoplasma gondii</i>	4
II.1 Le parasite	4
II.2 Stades parasitaires	4
1. Le tachyzoïte	4
2. Le kyste	5
3. Le sporozoïte	5
II.3 Cycle parasitaire	6
II.4 Biodiversité et virulence	8
II.5 Structures moléculaires de <i>T.gondii</i>	11
1. Les protéines de surface (SAG)	12
2. Les protéines de micronèmes (MIC)	12
3. Les protéines de rhoptries (ROP)	12
4. Les protéines de granules denses (GRA)	13
III. La toxoplasmose	14
III.1 La toxoplasmose acquise	14
III.2 La toxoplasmose congénitale	15
III.3 La toxoplasmose de l'immunodéprimé	15

IV. Réponse immune au cours de la toxoplasmose	16
IV.1 Réponse immune non spécifique	16
IV.2 Réponse immune spécifique	16
1. Les différents intervenants	17
<i>1.1. Les macrophages</i>	17
<i>1.2. Les neutrophiles</i>	17
<i>1.3. Les cellules dendritiques</i>	18
<i>1.4. Les cellules NK</i>	20
<i>1.5. Les lymphocytes B</i>	20
<i>1.6. Les lymphocytes T</i>	20
2. Les cytokines	21
<i>2.1. Cytokines protectrices</i>	21
<i>2.2. Cytokines régulatrices</i>	24
IV.3 Mécanismes d'échappement du parasite	25
V. Protéine de surface : SAG1	27
V.1 Caractéristiques moléculaires et structure	27
V.2 Immunité protectrice liée à SAG1	31
V.3 Approche vaccinale	32
VI. Objectifs	37

MATERIELS ET METHODES	38
I. Sélection de peptides spécifiques d'allèles	39
I.1 Souches	39
I.2 Séquençage de la région codante	41
I.3 Peptides	42
II. Immunoréactivité des peptides	42
II.1 Sérums humains	42
II.2 Quantification des anticorps spécifiques peptides	43
III. Protection et réponse immune après immunisation	44
III.1 Protocole expérimental	44
1. Souche virulente	44
2. Souche chronique	44
III.2 Techniques utilisées	46
1 Quantification des anticorps spécifiques peptides	46
2. Détection des Anticorps par Western blot	46
3. Détection des Anticorps par Immunofluorescence	47
4. Quantification de la charge parasitaire	48
<i>4.1 AnaLyse microscopique</i>	48
<i>4.2 Analyse par PCR quantitative</i>	48

IV. Effets des peptides de SAG-1 sur les propriétés immunomodulatrices des cellules dendritiques humaines immatures	49
IV.1 Isolement des monocytes humains et des lymphocytes T CD4⁺	49
IV.2 Genèse de cellules dendritiques à partir des monocytes sanguins	50
IV.3 Protocole expérimental d'activation des cellules dendritiques immatures par les peptides spécifiques d'allèles	51
IV.4 Immunophénotypage membranaire et intracellulaire des monocytes, des cellules dendritiques et des lymphocytes par cytométrie en flux	51
1. Les anticorps monoclonaux utilisés	51
2. Marquage membranaire des monocytes et des cellules dendritiques	52
3. Marquage membranaire des lymphocytes T CD4⁺	53
4. Marquage intracytoplasmique de l'IL-4 et de l'IFN-γ dans les populations lymphocytaires T CD4⁺	53
<i>4.1. Perméabilisation cellulaire</i>	53
<i>4.2 Marquage intracytoplasmique</i>	54
5. Analyse par cytométrie en flux	54
IV.5 Analyse du niveau d'expression des ARNm codant pour les cytokines par technique de RT-PCR	55
1. Extraction des ARN totaux	55
2. Quantification des ARN	55
3. Synthèse des ADN complémentaires (ADNc) et PCR	55

IV.6	Dosage immuno-enzymatique des cytokines	57
IV.7	Présentation d'antigène et réaction de prolifération lymphocytaire	57
IV.8	Co-culture et production de cytokines par les lymphocytes	58
V.	Analyse statistique	58
RESULTATS		59
I.	Sélection de peptides antigéniques	60
II.	Immunoréactivité des peptides	62
III.	Protection et réponse immune après immunisation	65
III.1	Immunisation et infestation par une souche virulente	65
III.2	Immunisation et infestation par une souche avirulente	65
1.	Quantification des anticorps spécifiques peptides (ELISA indirecte)	65
2.	Détection des Anticorps par Western blot	70
3.	Détection des Anticorps par Immunofluorescence	70
4.	Quantification de la charge parasitaire	72
<i>4.1</i>	<i>Analyse microscopique</i>	72
<i>4.2</i>	<i>Analyse par PCR quantitative</i>	74

IV. Etude de l'effet des peptides 251-265/I et 251-265/II-III dérivés de SAG-1 sur les propriétés immunomodulatrices des cellules dendritiques humaines immatures	75
IV.1 Effets des peptides 251-265/I et 251-265/II-III sur la maturation des cellules dendritiques humaines	75
IV.2 Effets des peptides 251-265/I et 251-265/II-III sur la production de cytokines par les cellules dendritiques humaines	82
IV.3. Co-culture de lymphocytes humains autologues avec des cellules dendritiques immatures pulsées par les peptides 251-265/I et 251-265/II-III : conséquences sur la prolifération des lymphocytes T et la synthèse d'IFN-γ par les lymphocytes T	89
DISCUSSION	94
PERSPECTIVES	107
CONCLUSION	117
BIBLIOGRAPHIE et ANNEXES	120

ANNEXE	142
Liste des publications	143
Communications orales	144
Communications affichées	144
Article 1 : <i>Toxoplasma</i> strain type and human disease : risk of bias during parasite isolation ?	145
Article 2 : <i>Toxoplasma gondii</i> SAG1 derived peptides: Recognition by human sera and protective immunity against infection in mice.	149
Article 3 : Peptides derived from two different alleles of SAG1 discriminating type I from non-type I <i>Toxoplasma gondii</i> strains induce differential cytokine production by immature human dendritic cells.	172

Index des figures

Figure 1 : Structure d'un tachyzoïte et d'un bradyzoïte en microscopie électronique à balayage	6
Figure 2 : Cycle parasitaire de <i>T.gondii</i> .	7
Figure 3 : Voies de signalisation conduisant à la production d'IL-12	19
Figure 4 : Séquence du gène SAG1 décrite par Burg en 1988	29
Figure 5 : Carte structurale des polymorphismes connus de SAG1	31
Figure 6 : Séquence et épitopes antigéniques du gène SAG1	61
Figure 7 : Dosage des IgG dans les sérums de souris immunisées par Elisa utilisant différents coatings	67
Figure 8 : Dosage des IgG1	68
Figure 9 : Dosage des IgG2a	69
Figure 10 : Western blot avec les antigènes solubles de la souche RH	71
Figure 11 : Immunofluorescence sur tachyzoïtes de la souche RH	72
Figure 12 : Effets de l'immunisation sur le nombre de kystes chez la souris infectée par <i>T.gondii</i>	73
Figure 13 : Expression des molécules CD14, CD80, CD83, CD86 et CD1a à la surface des monocytes et des cellules dendritiques immatures	78

Figure 14 : Expression des molécules CD14, CD80, CD83, CD86 et CD1a à la surface des cellules dendritiques immatures traitées par le LPS ou le peptide irrelevant	79
Figure 15 : Expression des molécules CD14, CD80, CD83, CD86 et CD1a à la surface des cellules dendritiques humaines immatures traitées par un extrait soluble de <i>Toxoplasma gondii</i> et par les peptides 251-165/I et 251-265/II-III dérivés de SAG-1	80
Figure 16 : Etude du niveau d'expression des ARNm de l'IL-12, du TNF- α , de l'IL-6 et de l'IL-10 dans les cellules dendritiques immatures non traitées ou traitées par les peptides 251-265/I et 251-265/II-III	85
Figure 17 : Analyse quantitative du niveau d'expression des ARNm de l'IL-12, du TNF- α , de l'IL-6 et de l'IL-10 dans les cellules dendritiques immatures non traitées ou traitées par les peptides 251-265/I et 251-265/II-III	86
Figure 18 : Etude du niveau de production de l'IL-12, du TNF- α , de l'IL-6 et de l'IL-10 dans les surnageants de culture de cellules dendritiques immatures non traitées ou traitées par un peptide irrelevant ou par le LPS	87
Figure 19 : Etude du niveau de production de l'IL-12, du TNF- α , de l'IL-6 et de l'IL-10 dans les surnageants de culture de cellules dendritiques immatures traitées par les peptides 251-265/I et 251-265/II-III	88
Figure 20 : Etude de la prolifération autologue lymphocytaire T dans des co-cultures utilisant des cellules dendritiques immatures pulsées avec les peptides 251-265/I ou 251-265/II-III	92

Figure 21 : Etude du niveau d'expression intracellulaire de l'IFN- γ et de l'IL-10 par des lymphocytes T CD4+ au cours de co-cultures avec des cellules dendritiques Immatures pulsées avec les peptides 251-265/I ou 251-265/II-III	93
Figure 22 : Arbre phylogénique sur la base des alignements de 29 séquences de GRA7	112
Figure 23 : Typage des souches par RFLP-PCR	114

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Descriptif des principaux essais de protection vaccinale par SAG1	
Tableau 1A : SAG1 recombinante	33
Tableau 1B : SAG1 en association avec un plasmide	33
Tableau 1C : SAG1 purifiée	34
Tableau 1D : Peptides de SAG1	35
Tableau 2 : Résumé du plan expérimental	36
Tableau 3 : Souches de <i>T. gondii</i>	37
Tableau 4 : Programme d'immunisation et d'infestation par une souche chronique	40
Tableau 5 : Conditions de PCR	45
Tableau 6 : Position et séquence de peptides dérivés de SAG1	56
Tableau 7 : Réactivité des peptides en ELISA avec un panel de sérums humains positifs et négatifs	62
Tableau 8 : Immunoréactivité des peptides envers des sérums typés	63
Tableau 9 : Nombre de parasites chez la souris Swiss à J30 postinfection	64
Tableau 10 : Analyse phénotypique des cellules dendritiques humaines immatures traitées par différentes concentrations des peptides 251-165/I et 251-265/II-III	74
	81

Tableau 11 : Souches de <i>Toxoplasma gondii</i>	109
Tableau 12 : Sites de polymorphisme au niveau des nucléotides et des acides aminés pour la région codante du gène GRA7	111
Tableau 13 : Analyse par RFLP-PCR de la zone codante du gène GRA7	113

Abréviations

A280 :	Absorbance 280
AA :	Acide Aminé
AC :	Anticorps
ACF :	Adjuvant Complet de Freund
ADN:	Acide Désoxyribonucléique
ADNc:	Acide Désoxyribonucléique complémentaire
AIF :	Adjuvant incomplet de Freund
APC :	Allophycocyanine
ARNm :	Acide Ribonucléique messenger
BSA :	Bovine Serum Albumin
CCR :	Récepteurs des Chimiokines
CHU:	Centre Hospitalier Universitaire
CMH :	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CRB :	Centre de Ressources Biologiques
CT :	Cycles Seuils
DL :	Dose Létale
DNTP :	Désoxynucléotide Triphosphate
ELISA :	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ESP :	Excreted/Secreted Protein
FACS :	Fluorescence Activated Cell Sorter
FITC :	Fluorescein Isothiocyanate
GM-CSF :	Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor
GPI :	Glycosylphosphatidylinositol
GRA :	Granules Denses
HPLC :	High Pressure Liquid Chromatography
HRP :	Horse Radish Peroxydase
IFN :	Interferon
Ig :	Immunoglobuline
IRAK :	IL-1R-Associated Kinase

IL :	Interleukine
INOS :	Inductible Nitric Oxyde Synthetase
LPS :	Lipopolysaccharide
MAPK :	Mitogen Activated Protein Kinase
MBS :	M-maleimidobenzoil- <i>N</i> -hydroxysuccinimide ester
MIC :	Micronèmes
MyD88 :	Myeloid Differentiation Factor 88
NFκB :	Nuclear factor-κB
NK:	Natural Killers
NO :	Oxyde Nitrique
NTPases :	Nucléosides Triphosphates Hydrolases
OPD :	O-Phenyldiamine
Pb :	Paire de Base
PBS :	Phosphate Buffer Saline
PCR :	Polymerase Chain Reaction
PFA :	Paraformaldéhyde
PI :	Peptide Irrelevant
RAPD :	Random Amplified Polymorphic DNA
RFLP :	Restriction Fragment Length Polymorphism
RPE :	Rhodamine Phycoerythrine
ROP :	Rhoptrie
RT:	Reverse Transcriptase
SAG :	Surface Antigen
SCID :	Severe Combined Immunodeficiency
SDS-PAGE :	Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SIDA :	Syndrome de l'Immunodéficience Acquise
SRS :	SAG1-Related Sequence
SVF :	Sérum de Veau Fœtal
TE:	Tampon d'Elution
<i>T.gondii</i> :	<i>Toxoplasma gondii</i>
TGF-β :	Transforming Growth Factor-β
TNF-α :	Tumor Necrosis Factor
TSA:	<i>T.gondii</i> Sonicate Antigen
TLRs :	Toll Like Receptor

UNG: Uracyl-N-Glycolase
UTR : Untranslated Region
VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine
Z : Zymodème

Introduction

I. Préambule

Toxoplasma gondii est un parasite protozoaire intracellulaire ubiquitaire, largement répandu sous toutes les latitudes et infestant tous les animaux homéothermes. Il est responsable de la toxoplasmose, affection cosmopolite très répandue et généralement bénigne chez les sujets immunocompétents, mais pouvant être responsable de formes cliniques sévères en fonction de l'hôte et des souches impliquées. *T. gondii* peut en effet: i) entraîner cécité, retard intellectuel, hydrocéphalie, voire décès, chez les enfants atteints de toxoplasmose congénitale (celle-ci fait l'objet en France d'un dépistage systématique par le biais d'un suivi sérologique maternel, et concerne de 1 à 3 enfants pour 1000 naissances), ii) être responsable chez l'adulte d'infections sévères, parfois mortelles (patients immunodéprimés).

Lors de l'infestation, les tachyzoïtes (forme à multiplication rapide) assurent la dissémination de l'infection chez l'hôte. Ils possèdent des antigènes (dont la protéine de surface SAG1) responsables du déclenchement de la réponse immune de l'hôte et de la régulation de la virulence. Une réponse immune adaptée permet à l'hôte de contrôler l'infection (destruction des tachyzoïtes) sans pour autant éliminer les kystes contenant les bradyzoïtes (dénués de SAG1) à l'origine de l'immunité définitive.

Le type de souche est l'un des facteurs clés suspecté de jouer un rôle dans l'expression de la pathogénicité chez l'homme. La plupart des souches (environ 90%) sont classées dans l'une des trois lignées clonales (**Sibley et Boothroyd, 1992; Dardé, 1996**). L'une de ces lignées (type I) est très virulente dans les infections murines (dose létale $DL_{100} = 1$), le type II est avirulent et le type III est considéré de virulence intermédiaire chez la souris ($DL_{50} \geq 10^3$). Les 3 lignées de *T. gondii* diffèrent de seulement 1 à 2% au niveau de leur séquence ADN (**Howe et Sibley, 1995**) et le polymorphisme est typiquement limité à 2 allèles au niveau de chaque locus (**Grigg et coll., 2001a**). Les différences phénotypiques marquées entre les souches dépendent probablement d'un nombre limité de variations génotypiques (**Su et coll., 2002**).

Des études initiales ont décrit une association entre un locus lié à SAG1 (protéine majeure de surface du parasite) sur le chromosome VIII et la virulence aiguë chez la souris (**Howe et coll., 1996**). SAG1 est une protéine de surface immunodominante durant la phase précoce de l'infection et cible d'une réponse immune forte (utilisée dans le cadre du diagnostic biologique). SAG1 est également immunogène et a été employée pour le développement de stratégies vaccinales dans la toxoplasmose (**Khan et coll., 1991; Bülow et Boothroyd, 1991; Petersen et coll., 1998; Letscher-Bru et coll., 1998; Chen et coll., 1999; Nielsen et coll., 1999; Angus et coll., 2000**). Enfin, elle joue un rôle important dans la pathogénie (**Windeck et Gross, 1996; Sibley et coll., 1999**). De multiples gènes homologues de SAG1 ont ensuite été identifiés et ont conduit à l'identification d'une famille de gènes (**Manger et coll., 1998**).

Des peptides synthétiques représentant des régions spécifiques de protéines peuvent induire des réponses humorales et cellulaires spécifiques de ces protéines (**Steward et Howard, 1987**). **Kong et coll.** (2003) ont démontré l'existence de sites antigéniques polymorphiques et immunodominants chez *T. gondii*. **Lehmann et coll.** (2000) ont montré que 6 des 7 mutations retrouvées dans la zone codante du gène SAG2 conduisaient à des modifications en acides aminés. Un taux élevé de mutations non silencieuses (8 remplacements vs 2 silencieuses) avait également été décrit pour la zone codante de SAG1 (**Bülow et Boothroyd, 1991**). Ces sites de polymorphisme séparent l'allèle 1 retrouvé chez les souches de type I et certaines souches atypiques, de l'allèle 2 associé aux souches non virulentes (types II et III). A ce jour, 24 sites ont été décrits (**Rinder et coll., 1995; Windeck et Gross, 1996; Marlé, DEA biomolécules et dynamique cellulaire, 2001**). Dans la région codante, 10 sites séparent actuellement les souches de type I, des souches de types II et III. En outre, ces zones de polymorphisme sont focalisées au niveau du feuillet D2 (**He et coll., 2002**) dans des zones d'antigénicité maximale (**Alix, 1999**). Lors de l'infection, SAG1 étant exposée au système immunitaire, une pression immunologique est exercée sur ce gène, et nous avons postulé que les zones de polymorphisme pouvaient être immunogènes, immunodominantes et en relation avec le phénotype de virulence.

Nous avons ainsi choisi une zone de 15 AA (acides aminés) présentant 2 sites de polymorphisme séparant les souches de type I des souches de type non I, associée à une antigénicité importante prédite par un algorithme utilisant l'association de la structure secondaire, de l'hydrophilie, de l'accessibilité à la surface et de la flexibilité (Alix, 1999).

Nous avons ainsi synthétisé deux peptides spécifiques d'allèles que nous avons comparés avec un peptide déjà décrit dans la littérature (Godard et coll., 1994) pour sa capacité à être reconnu par la réponse immune et cellulaire et à protéger la souris d'une infestation par *T. gondii*.

Nous rapportons dans ce travail l'analyse des propriétés antigéniques et immunogènes de ces deux peptides spécifiques d'allèles de la protéine SAG1 de *T. gondii*.

II. *Toxoplasma gondii*

II.1 Le parasite

T. gondii est un protozoaire ubiquiste capable d'infester les animaux à sang chaud sans spécificité cellulaire. C'est en 1908, à l'institut Pasteur de Tunis, que Nicolle et Manceaux, l'isolent chez un rongeur sauvage, *Ctenodactylus gondii*, utilisé comme modèle expérimental dans la leishmaniose.

T. gondii est la seule espèce décrite dans le genre *Toxoplasma*.

II.2 Stades parasitaires

Le cycle est constitué de trois stades infectieux: le tachyzoïte, le bradyzoïte et le sporozoïte. Chaque stade présente un rôle biologique distinct.

1. Le tachyzoïte

Le tachyzoïte (ou trophozoïte) est la forme proliférative du parasite lors de la phase active de l'infection. C'est une cellule asymétrique en forme de croissant de 5 à 10 µm de long sur 2 à 5 µm de large. Son extrémité antérieure est effilée et son extrémité postérieure est plus large et plus arrondie (Figure 1). *T. gondii*, comme tous les Apicomplexa, possède dans sa partie antérieure un complexe apical comprenant un conoïde, des rhoptries, des micronèmes et des granules denses. Il n'a pas d'organes locomoteurs visibles tels que cils ou flagelles mais pénètre dans la cellule hôte par son conoïde (**Dubey et coll., 1998**). Après pénétration active dans la cellule hôte, le tachyzoïte s'entoure d'une vacuole parasitophore où il se multiplie par endodyogénie. Le tachyzoïte est capable d'envahir n'importe quel type cellulaire (**Carruthers et Sibley, 1997**). Ce phénomène conduit à la mort cellulaire et à l'invasion rapide des cellules voisines. Le tachyzoïte est disséminé via le sang et le système lymphatique dans la majorité des

organes du corps humain (**Bhopale, 2003 a**). Le taux d'invasion varie suivant la souche de *T. gondii* et le type cellulaire (**Kaufman et Maloney, 1962; Appleford et Smith, 1997**). La forme tachyzoïte est très fragile dans le milieu extérieur. Lors de l'instauration de l'immunité spécifique chez l'hôte, il y a interconversion de la forme tachyzoïte vers la forme bradyzoïte conduisant à la formation de kystes contenant les bradyzoïtes (**Bhopale, 2003 a**).

2. Le kyste

Le kyste est une forme de latence et de résistance intratissulaire. Il est volumineux (15 à 100 μm de diamètre). Les kystes prédominent durant l'infection chronique et sont produits précocement après la contamination (**Dubey, 1998**). Ils sont retrouvés préférentiellement dans le système nerveux central et dans les muscles mais aussi au niveau d'autres viscères et de l'œil. Ils peuvent contenir des centaines à des milliers de bradyzoïtes (Figure 1). Ces derniers ont une morphologie proche des tachyzoïtes et sont plus résistants notamment à la digestion gastrique (**Jacobs et coll., 1960**). Ils se multiplient plus lentement (**Tomavo, 2001**). Les bradyzoïtes persistent à l'intérieur des kystes durant toute la vie de l'hôte, entretenant, chez l'homme, une immunité protectrice.

3. Le sporozoïte

Le sporozoïte est présent dans les oocystes sporulés au nombre de huit. Ces derniers sont formés lors de la reproduction asexuée chez l'hôte définitif (félin). Durant la phase aiguë de l'infection, des milliers d'oocystes non sporulés sont émis dans les fèces de chats. Après sporulation dans le milieu extérieur, il se forme deux sporocystes contenant 4 sporozoïtes, chacun présentant une morphologie comparable aux stades précédents.

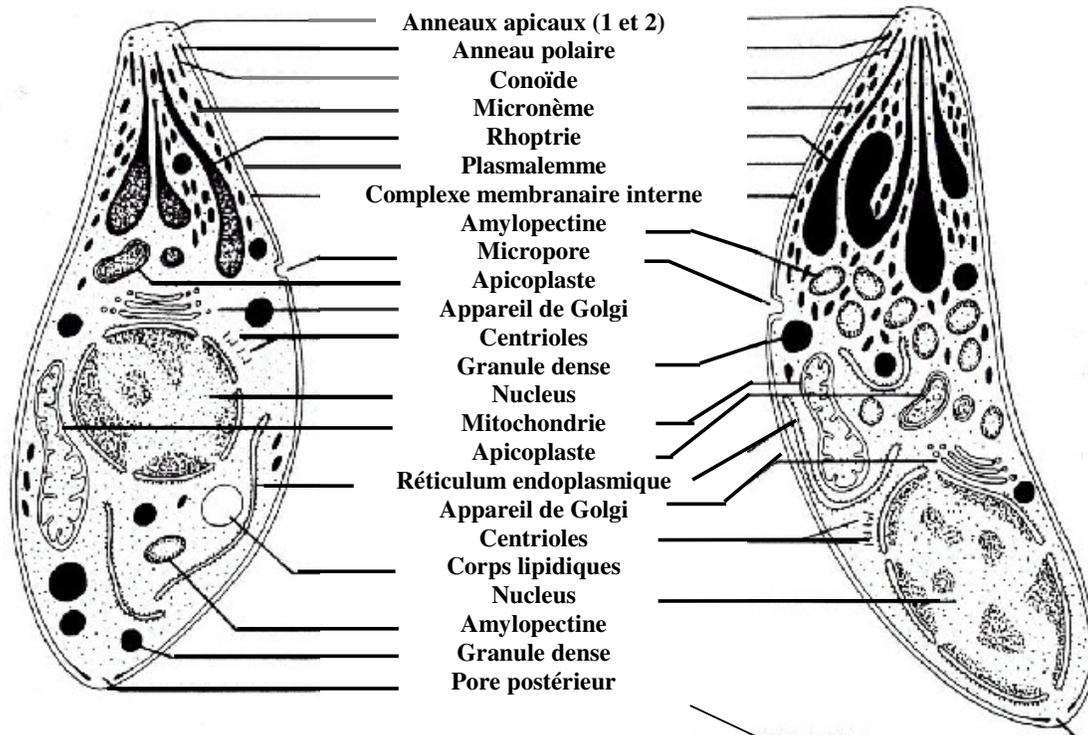


Figure 1 : Structure d'un tachyzoïte (gauche) et d'un bradyzoïte (droite) en microscopie électronique à transmission. (Dubey et coll., 1998).

II.3 Cycle parasitaire

Le cycle de *T. gondii* est caractérisé par deux phases : une phase de reproduction sexuée se déroulant exclusivement chez l'hôte définitif (le chat et d'autres félinés) et une phase asexuée, chez les hôtes intermédiaires (tous les animaux à sang chaud) (Figure 2).

Le cycle asexué se déroule chez tous les hôtes par ingestion de kystes ou par ingestion d'oocystes matures. Après contamination, les bradyzoïtes ou les sporozoïtes se transforment en tachyzoïtes. Ceux-ci seront disséminés rapidement dans tout l'organisme par voie lymphatique ou sanguine. Cette phase de dissémination et de multiplication correspond à la phase aiguë de

la toxoplasmose et ne dure que quelques jours avant que les parasites ne s'enkystent sous la pression du système immunitaire.

La reproduction sexuée a lieu dans les entérocytes de l'hôte définitif qui se contamine habituellement en ingérant des proies porteuses de kystes ou des végétaux souillés d'ocystes. Après plusieurs multiplications asexuées (schizogonie) qui se déroulent dans les tissus extra-intestinaux, des éléments sexués (gamétocytes) apparaissent. La fécondation conduit à la formation d'ocystes non sporulés rejetés avec les fèces du chat dans le milieu extérieur, lors de la primo-infestation. Ces derniers sporulent et acquièrent leur caractère infectieux. Les ocystes, qui peuvent rester quiescents pendant plus d'une année dans le sol, sont très résistants et capables d'infecter tous les animaux homéothermes dont l'homme.

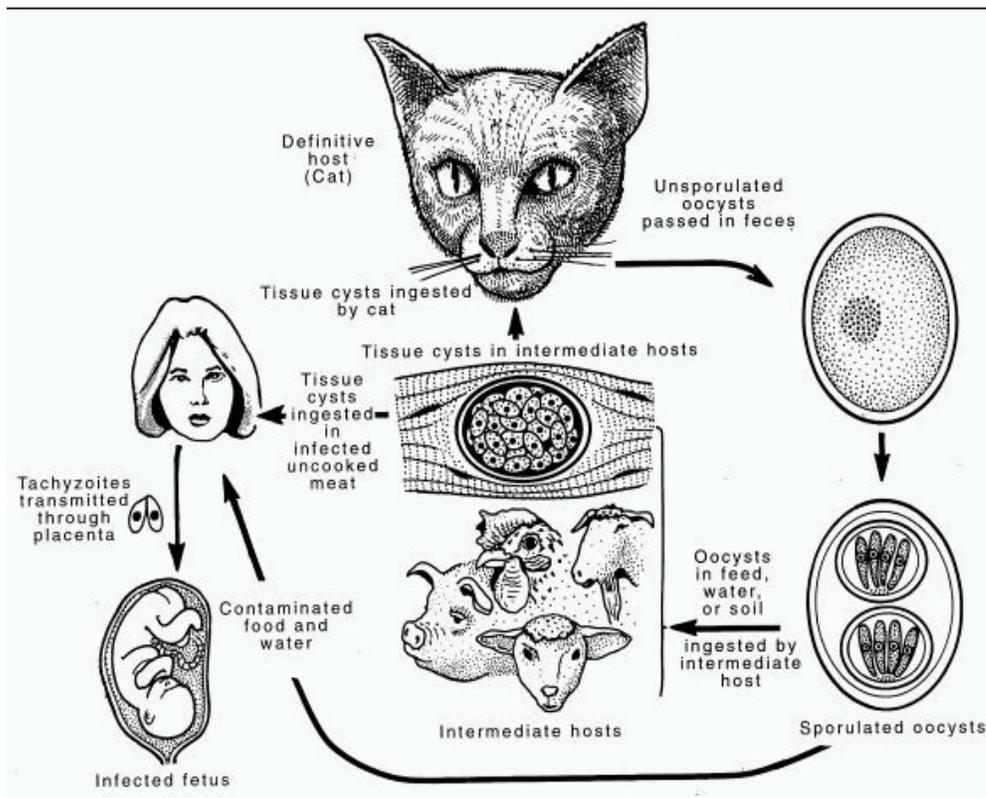


Figure 2 : Cycle parasitaire de *T. gondii*. (Dubey, 1998)

II.4 Biodiversité et virulence

Le genre *Toxoplasma* est constitué d'une seule espèce avec des différences intra-spécifiques significatives. La classification actuelle des souches est basée sur la pathogénicité chez la souris et la variabilité de marqueurs génétiques spécifiques.

Les premières études sur les souches de *T. gondii* ont montré que les isolats étaient remarquablement similaires (**Ferguson et Hutchison, 1981**). Depuis, la biodiversité des isolats a été explorée par des techniques phénotypiques et génotypiques.

L'analyse isoenzymatique, utilisant six systèmes enzymatiques différents, a permis de regrouper les souches en zymodèmes (**Dardé et coll., 1992 ; Dardé, 1996**). Ainsi, 12 zymodèmes sont distingués : le zymodème 1 (Z1) regroupe 12 isolats très pathogènes pour la souris, correspondant aux souches de type I. Le groupe Z2, Z4 et Z8 correspondant aux souches de type II, représente plus de 60 % des isolats étudiés. Le zymodème 3 (Z3) comprend des isolats de pathogénicité intermédiaire, correspondant aux souches de type III. Les autres zymodèmes ne contiennent que peu d'isolats.

Des techniques de biologie moléculaire (PCR-RFLP et RAPD) ont ensuite été proposées, permettant de mettre en évidence des polymorphismes génétiques entre les souches. Ainsi, la structure clonale de la population de *T. gondii* est retrouvée par PCR-RFLP suggérant l'existence de 3 lignées prédominantes (type I, II et III) trouvées chez des hôtes variés dont l'homme (**Howe et Sibley, 1995**).

Sibley et Boothroyd (1992) ont proposé un classement de différentes souches de *T. gondii* en trois groupes ou types selon leur comportement chez la souris (après inoculation intrapéritonéale de tachyzoïtes à des souris Swiss).

- Type I : la virulence est caractérisée par le fait qu'un simple organisme peut conduire à la mort de la souris en 8 à 12 jours quel que soit le fond génétique de l'hôte (**Howe et coll., 1996**). La dose létale est de 100% ($DL_{100} = 1$). Les isolats ont une capacité de répllication très rapide et

fabriquent peu de kystes. C'est le cas de la souche RH, isolée en 1939 et utilisée comme souche de référence.

- Type II : les souris survivent. La toxoplasmose est chronique et asymptomatique. Les kystes sont bien tolérés. Ces souches sont caractérisées par une faible vitesse de réplication en culture cellulaire mais une kystogénèse importante. La dose létale est de 50% ($DL_{50} \geq 10^3$ organismes).

- Type III: souches de pathogénicité intermédiaire. La toxoplasmose est subaiguë. Certaines souris meurent au bout de quinze jours alors que d'autres succombent au bout de trois à six mois d'encéphalite. La dose létale est de 50% ($DL_{50} \geq 10^3$ organismes).

La diversité allélique détectée par ces techniques (isoenzymatiques, PCR-RFLP) est faible pour la majorité des marqueurs (2 à 4 allèles par marqueurs) (**Dardé, 2004**). L'analyse des isolats par microsatellites a été proposée de façon plus récente. Les microsatellites sont des loci nucléaires contenant de petits motifs d'ADN (1 à 6 bases) répétés plusieurs fois. Cette méthode hautement discriminante, permet des études épidémiologiques ainsi que la détection d'infections mixtes (**Ajzenberg et coll., 2002 a**). L'utilisation de ces microsatellites en PCR multiplex permet un typage rapide de la majorité des isolats (**Ajzenberg et coll., 2005**).

L'ensemble de ces études ont confirmé une structure de population clonale pour *T. gondii* avec la présence de 3 génotypes dominants qui proviendraient de recombinaisons sexuées entre deux souches ancestrales (**Grigg et coll, 2001 a; Su et coll., 2003; Miller et coll., 2004**). Outre ces souches, il existe des souches recombinantes, peu nombreuses, qui varient en terme de virulence phénotypique chez la souris (**Fux et coll., 2003**).

Lors de l'isolement du parasite, il peut exister un risque de biais dans la détermination de la souche responsable de l'infection. Ainsi, nous avons montré la possibilité d'infections mixtes chez l'homme en rapportant la présence d'une souche de type I associée à une souche de type II par typage moléculaire directement effectué sur un liquide amniotique, alors que seule la

souche de type II a été isolée après inoculation à la souris du prélèvement (**Villena et coll., 2004, annexe**).

La pathogénicité de *T. gondii* peut être influencée par la dose infectante, la voie d'inoculation, le cycle du parasite et par le génotype de l'hôte et de la souche. Ainsi, il existe des manifestations cliniques variables dans les toxoplasmoses congénitales et des formes sévères de toxoplasmoses acquises chez les immunocompétents (**Dardé et coll., 1998**). Des corrélations fortes entre répartition géographique des isolats et génotype du parasite sont retrouvées. Les souches de *T. gondii* sont isolées chez l'homme et l'animal avec des disparités observées selon les génotypes. Ainsi, les souches de type II sont les plus communes chez l'homme et représentent environ de 80 % des isolats répertoriés (**Howe et Sibley, 1995; Howe et coll., 1997; Marlé, DEA biomolécules et dynamique cellulaire, 2001; Ajzenberg et coll., 2002 b**). Les souches de type I sont relativement rares chez les animaux à l'inverse des souches de type III qui sont surtout associées à des infections animales. Des études épidémiologiques cliniques ont montré une association forte entre génotype des isolats et pathogénicité chez l'homme. Ainsi, les souches de type I ou recombinantes sont responsables de signes cliniques sévères et sont plus souvent isolées dans les toxoplasmoses oculaires (**Vallochi et coll., 2005**) ; leur fréquence a été décrite comme augmentée dans les toxoplasmoses congénitales humaines (**Sibley et coll., 1999; Grigg et coll., 2001 b; Fuentes et coll., 2001; Fux et coll., 2003**) bien que ceci ne soit pas retrouvé en France où une majorité de type II est isolée (**Ajzenberg et coll., 2002 b; données du CRB**). La forte parasitémie induite par les souches de type I augmenterait le risque de transmission transplacentaire et la sévérité de l'infection pour le développement du fœtus.

Enfin, de récentes études ont montré que le phénotype virulent exprimé par les souches de type I chez la souris serait due à une surproduction de la réponse cytokinique de type Th-1 (**Gavrilescu et Denkers, 2001; Mordue et coll., 2001**). Ces taux extrêmement élevés de cytokines de type Th-1 incluant IL-12, IL-18, IFN- γ et TNF- α contribuent à la pathologie

cellulaire et conduisent à la mort de l'animal. Paradoxalement, ce sont ces mêmes cytokines qui sont nécessaires au contrôle de l'infection par les souches non virulentes. Dans ce cas, les cytokines sont produites à un niveau approprié et sont contre-régulées à la suite de leur induction (Mordue et coll., 2001)

II.5 Structures moléculaires de *T. gondii*

T. gondii, comme d'autres organismes unicellulaires, est composé d'une multitude d'antigènes (membranaires ou cytoplasmiques) immunogènes ou faisant partie des composants structuraux. La composition de la surface du parasite est modulée de manière importante au cours de l'interconversion bradyzoïtes/tachyzoïtes. Les tachyzoïtes et les bradyzoïtes ont une structure similaire mais produisent un phénotype différent dans la cellule. Le tachyzoïte en se multipliant rapidement, est responsable de la dissémination et de complications cliniques lors de la primo-infection ou lors des réactivations, contrairement au bradyzoïte qui se multiplie lentement et ne cause pas de dommages tissulaires significatifs. Les molécules exprimées à un stade spécifique semblent contrôler les différences phénotypiques entre tachyzoïtes et bradyzoïtes. On distingue les protéines de surface et les protéines contenues dans les organelles sécrétoires du parasite (micronèmes, rhoptries et granules denses) ; certaines de ces protéines peuvent être communes à plusieurs stades évolutifs.

1. Les protéines de surface (SAG)

La membrane plasmique du parasite est constituée de nombreuses protéines. Ses protéines sont d'une grande variété et regroupent la Superfamille des SRS (SAG1-related sequence) (**Jung et coll., 2004**). Les SRS sont des protéines de surface divisées en deux sous familles dont les membres prototypes sont SAG1 et SAG2A respectivement. Elles sont ancrées à la membrane par un glycosylphosphatidylinositol (GPI) (**Manger et coll., 1998**). SAG1, SAG2A et SAG3 participent aux premières étapes de l'invasion cellulaire dès la phase d'attachement (**Grimwood et Smith, 1992; Minéo et Kasper, 1994; Tomavo 1996; Velge-Roussel et coll., 2001**). SAG1 et SAG2A ne sont exprimées qu'au stade tachyzoïte (**Kasper et Ware, 1985**) alors que SAG3 est aussi exprimée au stade bradyzoïte (**Tomavo et coll., 1991**).

2. Les protéines de micronèmes (MIC)

T. gondii envahit les cellules par un mécanisme unique nécessitant la sécrétion de protéines des micronèmes (environ une vingtaine de protéines identifiées à ce jour). Elles sont libérées lors du contact initial du pôle apical du parasite avec la cellule hôte. Elles participent à l'attachement via des récepteurs spécifiques de la cellule hôte cible (**Carruthers, 2002**). La protéine MIC3 possédant un domaine lectine « like » reconnaissant les glycoprotéines à la surface de la cellule hôte, a été utilisée dans un modèle vaccinal induisant une réduction de la charge parasitaire lors d'une infection chronique (**Ismael et coll., 2003**). Elle serait liée au phénotype virulent des souches (**Cerede et coll., 2005**).

3. Les protéines de rhoptries (ROP)

Les rhoptries déchargent leur contenu avant la pénétration. Neuf protéines ont été identifiées. Elles sont essentielles à l'invasion, à la réplication du parasite et à l'interaction parasite-cellule hôte (**Carruthers, 1999**). Ces protéines ne sont pas retrouvées à la surface du parasite ou de la cellule cible. Elles participent à la biogenèse de la vacuole parasitophore et à

l'association des organelles de l'hôte. La protéine ROP2 exprimée à tous les stades du parasite, a été utilisée lors d'essais vaccinaux. (**Martin et coll., 2004, Leyva et coll., 2001, Vercammen et coll., 2000**).

4. Les protéines de granules denses (GRA)

Les granules denses sont des vésicules sécrétrices jouant un rôle majeur dans les modifications structurales de la vacuole parasitophore (**Mercier et coll., 2005**). Les protéines des granules denses sont libérées pendant et après l'invasion à l'intérieur de la vacuole. Quatorze protéines ont été identifiées : 10 protéines GRA (**Ferguson, 2004; Adjogble et coll., 2004; Ahn et coll., 2005**), 2 nucléosides triphosphates hydrolases (NTPases) (**Asai et coll., 1983; Johnson et coll., 2003**) et 2 inhibiteurs de protéases (**Morris et coll., 2002; Pszeny et coll., 2002**). Les protéines GRA s'associent à la vacuole parasitophore par des interactions hydrophobes ou protéines/protéines, au réseau tubulaire, elles interviennent également dans le recrutement des nutriments et dans l'inhibition des voies apoptotiques de la cellule hôte (**Mercier et coll., 2002; Carruthers, 2002; Nash et coll., 1998**). Elles participent à l'invasion, à la survie intracellulaire du parasite et à sa multiplication (**Cha et coll., 2001**). Exceptée pour GRA1 entièrement soluble, les autres protéines GRA peuvent se retrouver sous une forme soluble ou insoluble dans les granules denses (**Adjogble et coll., 2004**) et sont toutes des protéines excrétées/secrétées (ou ESP). Les protéines GRA semblent jouer un rôle dans la virulence aiguë des souches (**Nischik et coll., 2001**).

III. La Toxoplasmose

La toxoplasmose est une anthroponose ubiquitaire. L'infection est généralement asymptomatique chez les animaux et l'homme. La séroprévalence est corrélée avec les habitudes alimentaires et l'hygiène de vie d'une population (**Montoya et Liesenfeld, 2004**).

Différents modes de contamination existent dont les plus courants sont : l'ingestion de légumes et fruits souillés par des oocystes sporulés d'origine tellurique, l'ingestion de kystes lors de la consommation de viandes crues ou insuffisamment cuites et la contamination transplacentaire du fœtus (Figure 2). D'autres modes sont possibles mais plus rares tels que la transmission de tachyzoïtes libres contenus dans le sang, la salive, le lait ou lors de transmissions accidentelles au laboratoire, ou encore la transmission de kystes contenus dans les greffons lors de transplantations.

Les formes cliniques de la toxoplasmose sont généralement bénignes, cependant des formes graves peuvent être observées chez le fœtus et chez les immunodéprimés (notamment les patients atteints de SIDA). Trois formes cliniques principales sont distinguées: la toxoplasmose acquise postnatale du sujet immunocompétent, la toxoplasmose congénitale acquise *in utero* et la toxoplasmose acquise ou réactivée des immunodéprimés.

III.1 La toxoplasmose acquise

Cette primo infection est généralement inapparente. Des formes bénignes peuvent se manifester par la triade classique : adénopathies (indolores et volumineuses), fièvre et asthénie ; ces formes ganglionnaires guérissent spontanément le plus souvent sans traitement. Toutefois il existe des cas aigus de toxoplasmose acquise caractérisés par des atteintes viscérales, neurologiques ou cutanées (**Chandenier et coll., 2000**).

III.2 La toxoplasmose congénitale

La toxoplasmose congénitale survient par transmission materno-foetale. Elle peut se manifester par des hydrocéphalies, microcéphalies ou calcifications intracrâniennes pouvant entraîner des convulsions ou des retards psychomoteurs et des chorioretinites à l'origine de déficits visuels voire de cécité. Ces atteintes sont variables en fonction de la date de contamination survenue au cours de la grossesse. Plus celle-ci est précoce, plus les conséquences pour le fœtus sont dramatiques (**Ambroise-Thomas et coll., 2001**). La majorité des enfants infectés (87%) sont asymptomatiques à la naissance mais pourront développer des lésions pendant l'enfance ou l'adolescence (**Petersen et coll., 2001**). En France, la vérification du statut immunitaire vis à vis de la toxoplasmose est obligatoire pour toute femme enceinte ; en cas de séronégativité, il est impératif d'effectuer une surveillance sérologique mensuelle. En cas de séroconversion maternelle, la datation de l'infection permettra la proposition d'un diagnostic anténatal. La toxoplasmose congénitale représente environ 1,8 cas pour 1000 naissances en France (**Pinon et coll., 1986**), soit environ 400 à 600 cas par an (données InVS).

III.3 La toxoplasmose de l'immunodéprimé

Elle touche les sujets présentant une immunosuppression sévère et peut résulter soit d'une primo-infection dans le cadre d'une toxoplasmose acquise, soit d'une réactivation dans le cadre d'une toxoplasmose ancienne. Chez les patients VIH, les cas de toxoplasmose graves sont le plus souvent dus à une réactivation (**Aubert et coll., 1996**). Une grande majorité des réactivations s'expriment par l'encéphalite toxoplasmique (**Carruthers, 2002**) pouvant secondairement se généraliser. Depuis l'utilisation de chimiothérapies prophylactiques et de trithérapies antirétrovirales, la fréquence des toxoplasmoses cérébrales chez les patients atteints de SIDA a très largement diminué (**Abgrall et coll., 2001**).

IV. Réponse immune au cours de la toxoplasmose

IV.1 Réponse immune non spécifique

Elle participe au contrôle de l'infection et à la mise en place de la réponse immune spécifique. Elle débute au niveau de la muqueuse digestive puis s'étend à tout l'organisme. La muqueuse intestinale infestée, sécrète les cytokines et chémokines. Ces chémokines attirent les macrophages, monocytes, neutrophiles et lymphocytes au site de l'infection (**Mackay, 2001 ; Kasper et coll., 2004**). Le parasite stimule précocement la synthèse d'IL-12 par les cellules dendritiques et les macrophages (**Sher et coll., 1998**). L'IL-12 induit à son tour la production d'IFN- γ , cytokine majeure dans l'immunité anti-toxoplasmique, par les cellules NK et les cellules T (**Hunter et Remington, 1995; Gazzinelli et coll., 1993 et 1994**). L'IFN- γ agit en synergie avec le TNF- α pour activer les macrophages (**Sibley et coll., 1991**). Ces derniers limitent la multiplication du parasite en augmentant la production de radicaux libres et d'oxyde nitrique (NO) (**Miller et coll., 1999**) avant la mise en place de l'immunité cellulaire spécifique.

IV.2 Réponse immune spécifique

La résistance à la toxoplasmose est gouvernée par une immunité innée et adaptative. Cette immunité protectrice dépend de cytokines qui participent à la mobilisation et à l'activation de types cellulaires variés (**Denkers et Gazzinelli, 1998; Lieberman et Hunter, 2002**). Les cellules T, les macrophages, les cellules Natural Killers (NK) et les cellules dendritiques en sont les acteurs essentiels. Elle est caractérisée par un profil cytokinique de type Th-1 (TNF- α , IFN- γ et IL-12) (**Sayles et coll., 2000**). Ces cytokines participent au contrôle de la multiplication des tachyzoïtes et à l'initialisation de l'immunité à médiation cellulaire (**Subauste et coll., 1998 a; Denkers, 2003**).

1. Les différents intervenants

1.1. Les macrophages

Les macrophages jouent un rôle pivot dans la détection et l'élimination de microorganismes par phagocytose et dégradation dans le phagolysosome. Ces cellules sont capables d'initier une forte réponse inflammatoire par la synthèse de molécules proinflammatoires avec une fonction microbicide. Les macrophages peuvent produire un haut niveau d'IL-12 et présenter des peptides antigéniques en association avec des antigènes majeurs d'histocompatibilité et des molécules de co-stimulation. Cette synthèse d'IL-12 requière le parasite et la présence d'IFN- γ (**Reis e Sousa et coll., 1997**). Les macrophages semblent intervenir préférentiellement dans le maintien de la production d'IL-12 durant la phase chronique de l'infection pour éviter toute réactivation (**Yap et coll., 2000**). Ils participent à l'initialisation d'une immunité de type Th-1, cruciale pour le contrôle de l'infection (**Locksley, 1993**). *T. gondii* peut échapper à l'action phagocyte du macrophage par suppression de la synthèse de cytokines proinflammatoires en agissant au niveau de leurs cascades de signalisation (**Butcher et coll., 2001**).

1.2. Les neutrophiles

Les neutrophiles jouent un rôle dans la reconnaissance et la neutralisation d'organismes pathogènes. Ils sont rapidement mobilisés vers le lieu de l'infection après inoculation du parasite (**Bliss et coll., 2000**) et sont capables de sécréter des chémokines et des cytokines proinflammatoires dont l'IL-12 et le TNF- α (**Denkers et coll., 2003**). Une déplétion en neutrophiles induit une diminution de la résistance associée à une diminution de la réponse cytokinique de type I (**Bliss et coll., 2001**). Ces cellules participent à la protection dans les stades précoces de l'infection.

1.3. Les cellules dendritiques

Les cellules dendritiques sont des cellules sentinelles capables d'initier la reconnaissance. Elles sont décrites pour intervenir dans les phases précoces de l'infection en participant à la reconnaissance du pathogène. En rencontrant le pathogène, elles induisent la production de chémokines et cytokines pouvant attirer et activer d'autres types cellulaires comme les macrophages, les cellules NK et les cellules T. De nombreux travaux ont montré qu'en présence du parasite vivant, tué ou d'extraits d'antigènes (incluant SAG1), les cellules dendritiques étaient capables de synthétiser de grandes quantités d'IL-12 (**Grunvald et coll., 1996 ; Reis e Sousa et coll., 1997; Sher et Reis e Sousa, 1998; Fischer et coll., 2000; 2000; Schade et Fischer, 2001, Scott et Hunter, 2002**). Elles sont la principale source d'IL-12, cytokine jouant un rôle majeur dans la résistance. (**Gazzinelli et coll., 1993**). Ces cellules peuvent induire une réponse immune spécifique et une protection par diminution du nombre de kystes en modèle murin (**Bourguin et coll., 1998, Dimier-Poisson et coll., 2003**). De part leur capacité à synthétiser de l'IL-12, les cellules dendritiques jouent un rôle majeur dans le déclenchement et la polarisation des réponses immunes spécifiques et dans la protection à long terme durant les infections chroniques (**Yap et coll., 2000**).

L'induction par un pathogène d'une réponse Th-1/Th-2 dépend de signaux stimulateurs versus inhibiteurs délivrés par les cellules dendritiques régulant la sécrétion des cytokines des lymphocytes T primés. *T. gondii* ou ses antigènes solubles polarisent les cellules T CD4⁺ en Th-1. Le parasite exerce un effet polarisant en présence de cellules présentatrices d'antigènes. La polarisation Th-1 versus Th-2 ne dépend pas de la capacité des cellules dendritiques à sécréter des cytokines polarisantes (IL-12 et IL-4) mais est corrélée avec des états distincts d'activation de ces cellules. Une réponse Th-1, en modèle murin, est associée à une augmentation de l'expression des molécules de co-stimulation, à la production de chémokines et au déclenchement de voies de signalisation (**Jankovic et coll., 2004**). *T. gondii* déclenche deux cascades de signalisation menant à la production d'IL-12. La première nécessite la

protéine MyD88 (Myeloid Differentiation Factor 88), élément important de signalisation utilisé par les Toll-Like Receptor, après stimulation des macrophages, des cellules dendritiques ou des neutrophiles (Scanga et coll., 2002; Jankovic et coll., 2004). L'activation de MyD88 via les TLRs, attire les protéines IRAK (IL-1R-Associated Kinase). Ces événements sont ensuite suivis par le recrutement de TRAF-6 qui mène à l'activation des voies de signalisation de NFκB et des MAPK, induisant la transcription des gènes des cytokines proinflammatoires. La seconde implique seulement les cellules dendritiques et déclenche un signal via une protéine G (Aliberti et Sher, 2002a et 2002b). Le parasite extracellulaire libère de la cyclophiline (C-18) qui se lie au récepteur de chémokine CCR5 (Aliberti et coll., 2002). Ce dernier se couple à une protéine G et induit la production d'IL-12 (Figure 3). Cette double cascade conduit à une forte réponse polarisée de type Th-1 durant l'infection.

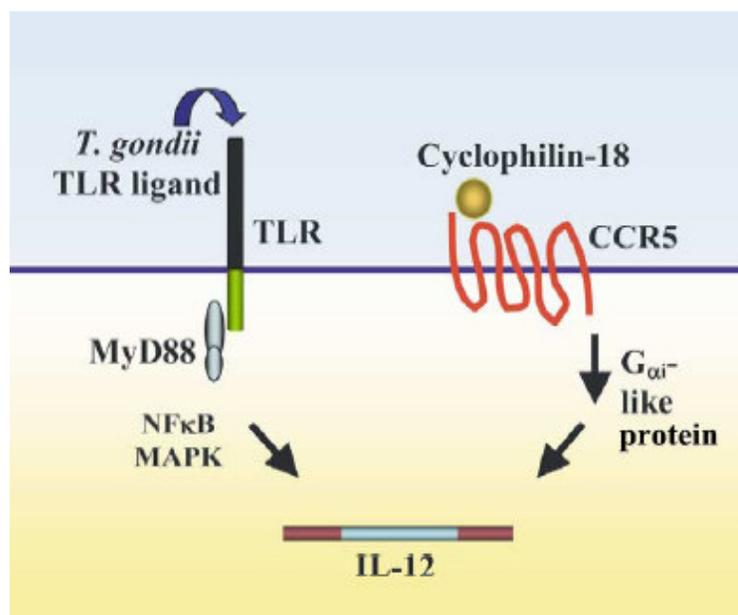


Figure 3 : Voies de signalisation conduisant à la production d'IL-12. Les tachyzoïtes stimulent les macrophages, les cellules dendritiques et les neutrophiles par MyD88. Les tachyzoïtes stimulent les cellules dendritiques en déclenchant un signal via une protéine G couplée à CCR5 (Denkers, 2003).

1.4. *Les cellules NK*

Les cellules NK synthétisent de l'IFN- γ et permettent la survie de l'hôte en initialisant l'immunité adaptative (**Sher et coll., 1993; Hunter et coll., 1994**). Le TNF- α et l'IL-12 sont des costimulateurs de la synthèse de l'IFN- γ par les cellules NK indépendamment de l'induction cellulaire T (**Sher et coll., 1993**).

1.5. *Les lymphocytes B*

Les cellules B naïves sont générées dans la moelle osseuse et migrent vers les organes lymphoïdes secondaires. Lorsque le parasite est localisé, les cellules B naïves portant les récepteurs spécifiques, sont retenues. Elles sont activées en association avec les cellules T spécifiques et les cellules dendritiques et déclenchent une expansion clonale, la différenciation des immunoglobulines et la maturation. (**Bell et coll., 1999**).

1.6. *Les lymphocytes T*

L'immunité cellulaire implique les lymphocytes CD4⁺ et CD8⁺, cellules majeures dans le mécanisme de résistance (**Suzuki et Remington, 1988**). Une déplétion en CD4⁺ et CD8⁺ induit une réactivation de la multiplication du parasite. Les patients avec une toxoplasmose congénitale oculaire présentent une diminution de la réponse proliférative lymphocytaire. (**Yamamoto et coll., 2000**). Les lymphocytes sont décrits pour leur action cytotoxique sur les cellules. Les Lymphocytes CD8⁺ confèrent une protection à long terme contre le parasite en synthétisant de l'IFN- γ et en lysant les cellules infectées et les parasites extracellulaires (**Gazzinelli et coll., 1993; Subauste et Remington, 1993**). Ils agissent durant la phase active de l'infection. Les lymphocytes CD4⁺ sont requis pour le développement de la résistance de l'hôte durant les phases précoces. Le contrôle de l'infection est le résultat d'une action synergique entre les cellules T CD4⁺ et CD8⁺ (**Subauste et coll., 1991**). Les cellules effectrices de type Th-1 synthétisent des cytokines telles que l'IFN- γ , le TNF- α et l'IL-12, essentielles au

contrôle de l'infection aiguë et chronique. Néanmoins des médiateurs de type Th-2 participent activement à la protection. L'IL-10, antagoniste, module la synthèse de l'IL-12 et de l'IFN- γ et évite ainsi toute réponse excessive qui pourrait conduire à une toxoplasmose aiguë et fatale (**Denkers et Gazzinelli, 1998**). L'équilibre hôte-parasite durant la phase chronique nécessite la régulation de la production de cytokines.

2. Les cytokines

Les cytokines sont des médiateurs solubles intercellulaires sécrétés le plus souvent par des leucocytes. Elles agissent généralement localement de manière paracrine ou autocrine et à faible dose. Dans le cas de la toxoplasmose, elles peuvent être divisées en deux groupes : protectrices ou régulatrices.

2.1. Cytokines protectrices

L'IFN- γ est sécrété principalement par les lymphocytes T et les cellules NK. Elle est la première cytokine impliquée dans la résistance à *T. gondii* (**Suzuki et coll., 1988, Subauste et Remington, 1991**). L'IFN- γ active les macrophages et les cellules NK et inhibe la réponse cellulaire T de type Th-2. Elle participe à la conversion du tachyzoïte en bradyzoïte et prévient la rupture des kystes dans les macrophages murins (**Bohne et coll., 1993**). La surproduction d'IFN- γ a été décrite pour les souches de type I en modèle murin (**Gavrilescu et Denkers, 2001**).

L'IL-12 est principalement synthétisée par les cellules dendritiques et les macrophages lors d'une stimulation antigénique. Elle intervient dans le déclenchement de l'immunité adaptative. Elle induit, entre autre, la production d'IFN- γ par les cellules NK et les cellules T. Elle intervient lors de la phase aiguë de l'infection et dans le maintien de l'immunité à long terme en modèle murin (**Yap et coll., 2000**). Sa synthèse est augmentée dans les infections

asymptomatiques par rapport aux toxoplasmoses acquises avec lésions (**Yamamoto et coll., 2000**).

Le TNF- α est produit par les monocytes, macrophages et les mastocytes. Il joue un rôle majeur dans les phases précoces de l'infection au niveau de la réponse non spécifique. En synergie avec d'autres cytokines (IL-12, IFN- γ ...), il stimule les cellules NK, active les macrophages et inhibe la réplication du parasite (**Sher et coll., 1993; Johnson, 1992**).

L'IL-2 est un important facteur de croissance impliqué dans l'activation et l'expansion des réponses cellulaires T. Des souris déficientes en IL-2 sont susceptibles à une toxoplasmose aiguë et perdent leur capacité à produire de l'IFN- γ . L'IL-2 semble avoir un rôle dans la génération des réponses cellulaires T spécifiques protectrices chez *T. gondii*. (**Villegas et coll., 2002**). Dans un modèle murin de vaccination, elle semble être protectrice en association avec SAG1 (**Chen et coll., 2002**).

L'IL-23 est une cytokine hétérodimérique avec une structure proche de l'IL-12. Elle pourrait augmenter la production d'IFN- γ par les cellules NK et T humaines (**Oppmann et coll., 2000; Parham et coll., 2002**). **Lieberman et coll., (2004 a)** ont montré chez la souris que l'IL-23 ne jouait pas un rôle dominant dans l'immunité protectrice. Par contre en absence d'IL-12, elle augmenterait la résistance à la toxoplasmose.

L'IL-15 est sécrétée par un grand nombre de cellules. Elle semble jouer un rôle dans la protection contre *T. gondii*. Son rôle est encore discutable. **Kahn et Kasper (1996)** ont démontré en modèle murin que l'IL-15 participait à l'immunité à médiation cellulaire T en générant des cellules T CD8⁺ antigènes spécifiques et en prolongeant de plus, leur activité cytotoxique (**Khan et Casciotti, 1999**). D'autres auteurs montrent que des souris déficientes en IL-15, développent à long terme une immunité protectrice contre *T. gondii* (**Lieberman et coll., 2004 b**).

L'IL-17 est une cytokine impliquée dans le développement et le recrutement des neutrophiles (**Ye et coll., 2001**). Les neutrophiles jouent un rôle important durant la phase précoce de l'infection à *T. gondii* (**Del Rio et coll., 2001**). Il semble que l'activation de ces derniers lors d'une infection à *T. gondii*, soit dépendante de l'IL-17. En effet chez des souris knockout pour le récepteur de l'IL-17, l'augmentation de la mortalité peut être attribuée à une diminution de la migration des neutrophiles (**Kelly et coll., 2005**).

L'IL-18 est une cytokine appartenant à la famille de l'IL-1. Sa fonction est similaire à l'IL-12 en agissant préférentiellement sur les cellules T et NK. Elle participe à la protection dans une variété d'infections bactériennes et parasitaires (**Dinarello, 1999**). L'utilisation de souris SCID (Severe Combined Immunodeficiency), dans le cas d'une infection à *T. gondii*, a montré que l'IL-18 ne semble pas requise à la résistance innée contre ce pathogène mais augmente l'activité cytotoxique des cellules NK (**Cai et coll., 2000**). L'administration d'IL-18 exogène augmente la protection contre *T. gondii* mais celle-ci est dépendante de l'IL-12 (**Jankovic et coll., 2001**). Une surproduction de cytokines de type Th-1, en particulier d'IFN- γ , d'IL-12 et d'IL-18, semble être associée à une toxoplasmose aiguë et létale. Dans un modèle murin, le haut niveau d'IL-18 n'est observé que chez les animaux succombant à l'infection. La neutralisation de cette cytokine en prolonge la survie (**Mordue et coll., 2001, Vossenkamper et coll., 2004**).

L'IL-5 et L'IL-6, cytokines de type Th-2, semblent avoir des rôles controversés. En effet, certaines études décrivent le rôle protecteur de ces cytokines à une infection à *T. gondii*, tandis que d'autres affirment le contraire. L'IL-5 est une glycoprotéine produite par les cellules T activées. Elle est essentielle à la production et à la fonction des éosinophiles. L'IL-5 peut induire une protection chez la souris et être pathogène (**Zhang et Denkers, 1999 ; Nickdel et coll., 2001**). L'IL-6 est sécrétée par de nombreux types cellulaires. Elle agit préférentiellement sur les cellules NK, cellules T et cellules B. Certaines études montrent chez la souris que l'IL-6

contrôle la croissance du parasite et l'inflammation et d'autres qu'elle pourrait favoriser sa multiplication intrapéritonéale (**Halonen et coll., 1998; Fang et coll., 1999; Lyons et coll., 2001**).

2.2. Cytokines régulatrices

L'IL-4 est une cytokine de type Th-2, sécrétée essentiellement par les cellules T CD4⁺. Elle régule la production de médiateurs inflammatoires et est impliquée dans la régulation négative de l'activité anti-toxoplasmique induite par l'IFN- γ et le TNF- α , contribuant à la prolifération du parasite dans les cellules humaines et murines (**Swierczynski et coll., 2000; Chaves et coll., 2001**). Des travaux sur des souris knockout ont montré que l'IL-4 réduisait à court terme la mortalité et augmentait à long terme la morbidité (**Roberts et coll., 1996**). Elle est aussi décrite comme protectrice dans le développement d'une encéphalite toxoplasmique en prévenant la formation de kystes chez la souris (**Suzuki et coll., 1996**). L'IL-4 est la fois protectrice et exacerbatrice de l'infection.

L'IL-10 est produite par une variété de cellules dont les cellules CD4⁺ et les macrophages. Elle possède d'importantes propriétés anti-inflammatoires et immunosuppressives (**Groux et coll., 1998**). Elle peut inhiber les fonctions des cellules T et des cellules NK lors d'une infection intracellulaire et réguler négativement les réponses immunes protectrices associées avec la résistance à *T. gondii* (**Neyer et coll., 1997**). Elle est essentielle pour limiter la pathologie induite par une surexpression des médiateurs proinflammatoires chez la souris (**Suzuki et coll., 2000; Lu et coll., 2003**). Néanmoins, elle ne contribue pas à la pathogénèse d'une souche virulente. L'IL-10 prévient les immunopathologies lors d'une primo infection à *T. gondii* mais n'est pas requise lors d'une réponse secondaire (**Wille et coll., 2004**).

Le Transforming Growth Factor- β (TGF- β) est un antagoniste de l'IL-12, du TNF- α , et de l'IFN- γ (**Hunter et coll., 1995; Langermans et coll., 2001**). Le TGF- β a été montré pour faciliter la réplication et la survie intracellulaire de l'organisme pathogène en inhibant la

capacité des macrophages à répondre à l'IFN- γ et au TNF- α en modèle humain et murin (**Bermudez et coll., 1993; Nagineni et coll., 2002**). Cette cytokine pourrait être impliquée dans des phénomènes immunopathologiques (**Filisetti et Candolfi, 2004**).

IV.3 Mécanismes d'échappement du parasite

Les parasites sont caractérisés par leur remarquable adaptation à l'hôte. *T. gondii* comme d'autres parasites intracellulaires, a développé différents mécanismes de résistance pour échapper aux pressions immunes de l'hôte. Ces procédés sont de plusieurs types :

L'immunosuppression: ce sont les mêmes effecteurs immunologiques qui peuvent diminuer la charge parasitaire et induire une réaction exacerbée. Il existe une intrication étroite entre les phénomènes immunopathologiques et les réactions de protection. Les mécanismes d'immunomodulation (IL-10,...) préviennent une immunopathologie de type Th-1 qui assure la survie de l'hôte et celle du parasite (**Mordue et coll., 2001**).

La vacuole parasitophore: en envahissant activement la cellule hôte, le parasite forme une vacuole l'isolant anatomiquement de la cellule hôte. *T. gondii* résiste ainsi aux dérivés actifs de l'oxygène et aux enzymes lysosomiales (**Lüder et Seeber, 2001**). Les protéines membranaires de la cellule hôte, à l'exception de celles liées à un groupement glycosylphosphatidylinositol, sont exclues de la vacuole (**Mordue et coll., 1999**). Ainsi les molécules qui permettent la reconnaissance sont éliminées. *T. gondii* empêche l'activation des défenses immunes (voie alterne du complément, anticorps, présentation de peptides antigéniques dérivés du parasite via les molécules du CMH II aux lymphocytes,...).

L'enkystement: la guérison apparente de la toxoplasmose correspond plutôt à un confinement de l'infection qui pourra être réactivée secondairement notamment en cas de déficit immunitaire de l'hôte. La localisation anatomique des kystes permet au parasite d'échapper aux effecteurs de l'hôte.

Le polymorphisme et la variation antigénique: le parasite exprime à sa surface des protéines stades spécifiques. La surface du tachyzoïte est ainsi constituée de protéines de surface très immunogènes (SAG1...). Dans le cas d'un stress immunologique, le parasite peut s'échapper en s'enkystant. Le passage du stade tachyzoïte au stade kystique implique des changements morphologiques, métaboliques et antigéniques pour s'adapter aux conditions environnementales (**Tomavo, 2001**).

Les cellules présentatrices d'antigènes: (i) *T. gondii* pénètre préférentiellement les cellules dendritiques immatures et empêche leur activation. Le recrutement de ces cellules immatures, altère leur capacité à présenter les antigènes parasitaires aux lymphocytes T (**Mckee et coll., 2004**). *T. gondii* modifie les fonctions de présentation antigénique et immunorégulatrices des cellules dendritiques, ce qui lui permet d'échapper à l'immunité innée et adaptative (**Sacks et Sher, 2002**). Les réponses lymphocytaires T peuvent être inhibées et les lymphokines utilisées comme facteur de croissance parasitaire. (ii) Lors de la pénétration dans les macrophages, *T. gondii* induit une diminution de l'adhésion aux composants de la matrice extracellulaire. Les macrophages sont alors disséminés par la lymphe et le sang et atteignent des zones privilégiées sans déclencher de fortes réponses inflammatoires (**Da Gama et coll., 2004**). La pénétration des macrophages affecte la translocation de NF- κ B, de Stat1 et la phosphorylation des MAPK. Le parasite bloque la synthèse de certaines molécules (telles que le TNF- α ou l'oxyde nitrique) (**Denkers et Butcher, 2005**).

L'apoptose: *T. gondii* est capable d'induire l'apoptose des cellules T CD4+ pendant la phase aiguë de l'infection. Ceci peut conduire à une inhibition partielle de certaines réponses lymphocytaires T (**Khan et coll., 1996**). De plus, le parasite possède une activité anti-apoptotique qui lui permet de persister dans la cellule infectée et de s'alimenter en métabolites pour sa croissance (**Goebel et coll., 2001; Sinai et coll., 2004**). Il est capable d'interférer sur le processus de mort cellulaire programmée en différents points de la cascade

signalétique pro-apoptotique notamment sur le cytochrome c mitochondrial (**Denkers et Butcher, 2005**). Ainsi, *T. gondii* a une action double en étant capable d'induire et d'inhiber l'apoptose cellulaire de l'hôte (**Luder et Gross, 2005**).

V. Protéine de surface : SAG1

La protéine majeure de surface SAG1 (ou P30) est exclusivement exprimée au stade tachyzoïte. Elle représente 3 à 5% des protéines totales. De part son antigénicité, SAG1 est un candidat favorable au développement de tests diagnostiques et de vaccins (**Kasper et Khan, 1993**). *T. gondii* stimule la production d'IgA, d'IgM et d'IgG anti-SAG1 (**Cesbron et coll., 1985; Santoro et coll., 1985; Mineo et coll., 1993**). Cette protéine est utilisée dans le sérodiagnostic de toxoplasmoses congénitales (**Villavedra et coll., 2001**) et de toxoplasmoses aiguës ou anciennes chez l'homme (**Pietkiewicz et coll., 2004**). Les anticorps monoclonaux dirigés contre cette protéine de surface, permettent de détecter le parasite intracellulaire dans la cellule hôte (**Shin et coll., 2004**). SAG1 semble jouer un rôle fonctionnel dans l'invasion cellulaire au niveau de la réorientation apicale (**Mineo et coll., 1994 b; Grimwood et Smith, 1996**), dans l'attachement (**Mineo et Kasper, 1994**) ainsi que dans la modulation de la réponse immune (**Khan et coll., 1991**).

V.1 Caractéristiques moléculaires et structure

Le gène de SAG1, séquencé par **Burg et coll. (1988)**, est un gène simple copie avec un ARNm d'une longueur de 1600 nucléotides et situé sur le chromosome VIII (**Jung et coll., 2004**). Ce gène ne contient pas d'introns et sa partie codante est constituée de 336 AA. De manière succincte, le gène de SAG1 présente deux sites potentiels d'initiation de la transcription, deux sites potentiels de la traduction par la présence de ces deux méthionines et un site de N glycosylation.

CGCGTGGTCTAACCACAAACCTTGAGACGCGTGTTC**CAACCACGCACCCTGACACGCGTGTTC****CAACCACGCACC**
CTGAGACGCGTGTTC**TAACCACGCACCCTGAGACGCGTGTTC****TAACCACGCACCCTGAGACGCGTGTTC****TGCCGC**
ACAATGTGCACCTGTAGGAAGCTGTAGTCACTGCTGATTCTCACTGTTCTCGGCAAGGGCCGACGACCGGAGTAC
AGTTTTTGTGGCAGAGCCGTTGTGCAGCTTCCGTTCTTCTCGGTTGTGTACATGTGTCAATTGTCGTGTA**AAAC**
ACACGGTTGTATGTCGGTTTCGCTGCACCACTTCATTATTTCTTCTGGTTTTTTGACGAGT**ATG**TTTCCGAAGGC
 AGTGAGACGCGCCGTACGGCAGCGGTGTTTGCCGCGCCCACTGATGTCGTTCTTGCGATGTGGCGTTATGGC
 ATCGGATCCCCCTCTGTGTTGCCAATCAAGTTGTCACCTGCCAGATAAAAAATCGACAGCCGCGGTCAATTCTCAC
 ACCGACGGAGAACCACTTCACTCTCAAGTGCCCTAAAACAGCGCTCACAGAGCCTCCCACTCTTGCGTACTCACC
 CAACAGGCAAATCTGCCAGCGGTACTACAAGTAGCTGTACATCAAAGGCTGTAACATTGAGCTCCTTGATTCC
 TGAAGCAGAAGATAGCTGGTGGACGGGGATTCTGCTAGTCTCGACACGGCAGGCATCAAACCTCACAGTTCCAAT
 CGAGAAGTTCCCCGTGACAACGCAGACGTTTGTGGTTCGGTTGCATCAAGGGAGACGACGCACAGAGTTGTATGGT
 CACAGTGACAGTACAAGCCAGAGCCTCATCGGTGTCATAAATGTCGCAAGGTGCTCCTACGGTGCAGACAGCAC
 TCTTGGTCTGTCAAGTTGTCTGCGAAGGACCCACTACAATGACCCTCGTGTGCGGGAAAGATGGAGTCAAAGTT
 CCTCAAGACAACAATCAGTACTGTTCCGGGACGACGCTGACTGGTTGCAACGAGAAATCGTTCAAAGATATTTG
 CAAAATTAAGTGAACCCGTTGGCAGGGTAACGCTTCGAGTGATAAGGGTGCCACGCTAACGATCAAGAAGGAA
 GCATTTCCAGCCGAGTCAAAAAGCGTCATTATTGGATGCACAGGGGGATCGCCTGAGAAGCATCACTGTACCGTG
 AACTGGAGTTTGCCGGGGCTGCAGGGTCAGCAAAATCGGCTGCGGGAACAGCCAGTCACGTTTCCATTTTTGCC
 ATGGTGATCGGACTTATTGGCTCTATCGCAGCTTGTGTGCGG**TG**AGTGATTACCGTTGTGCTCACTTCTCAAATC
 GACAAAGGAAACACACTTCGTGCAGCATGTGCCCAATTATAAAGAACTGAGTTGTTGCGCTGTGGCTTGCAGGT
 GTCACATCCACAAAAACCGCCGACTCTAAATAGGAGTGTTTCGCAGCAAGCAGCGAAAGTTTATGACTGGGTCC
 GAATCTCTGAACGGATGTGTGGCGGACCTGGCTGATGTTGATCGCCGTCGACACACGCGCCACATGGGTCAATAC
 ACAAGACAGCTATCAGTTGTTTTAGTCGAACCGGTTAACACAATTCTTGCCCCCCGA

Figure 4 : Séquence du gène SAG1 décrite par Burg en 1988.

▲ Site de clivage de la séquence signal

En **gras** ce sont les deux méthionines potentielles initiant la traduction

En **vert** : codon stop, En **bordeaux** : zone non codante

↷
 [] Site d'initiation de la transcription, |—| 5 à 6 portions répétées de 27 pb

Des domaines hydrophobes sont présents du côté N et C terminal, la portion C terminale servant à l'ancrage par un glycolipide (**Kim et coll., 1994**) tandis que la portion N terminale participe au transport de la protéine à la surface de la cellule. Il semblerait que ces régions soient absentes de la protéine mature, cette dernière subissant des modifications post-traductionnelles (Figure 4). La région 5'UTR de SAG1 contient une portion de 27 pb répétée cinq fois chez les souches virulentes et quatre fois pour les souches de type II et III (**Rodriguez et coll., 1985; Windeck et Gross, 1996**) ;

L'analyse cristallographique de SAG1 révèle une structure homodimérique parallèle avec une similitude entre les deux domaines (D1 et D2) de chaque monomère. Les dimères sont constitués de feuillets- β allongés avec des acides aminés chargés positivement présumant du rôle de cette protéine dans une liaison polyanionique avec un ligand tel que les protéoglycannes sulfatés. Les feuillets- β sont liés entre eux formant une structure stable. Chaque monomère possède 3 ponts disulfures situés à la même position et conservés chez les autres antigènes de cette famille et n'appartenant pas à la sous famille SAG2. La présence d'interactions hydrophobes et polaires implique que SAG1 existe à la surface du parasite sous cette configuration dimérique. Elle est liée à la surface de la cellule par sa partie C-terminale. Les sites de polymorphisme semblent être préférentiellement localisés dans les domaines D2 et ne représentent que 1 à 2 % de la région codante (Figure 5) (**He et coll., 2002**). Les souches de type II et III codent pour une protéine identique. Ainsi l'allèle 2 de SAG1 est invariablement associé aux types non virulents II et III (**Boothroyd et coll., 1998**).



Figure 5 : Carte structurale des polymorphismes connus (en rouge) de SAG1. La majorité des sites se retrouve au niveau des domaines D2 (He et coll., 2002).

V.2 Immunité protectrice liée à SAG1

L'immunité cellulaire est primordiale pour la protection de l'hôte contre *T. gondii*. SAG1 peut induire une forte réponse cellulaire T et B et la production d'IFN- γ (Khan et coll., 1988). Elle est aussi capable d'activer les macrophages qui ont une activité anti-toxoplasmique (Makioka et Kobayashi, 1991). Les cellules T CD8⁺ spécifiques-SAG1 supplémentées d'IFN- γ peuvent induire une protection significative contre les toxoplasmoses aiguës chez l'animal (Khan et coll., 1994). Prigione et coll. (2000) ont montré que des cellules T CD4⁺ spécifiques SAG1 sont impliquées dans le maintien à long terme de l'immunité à *T. gondii*. Une souche déficiente pour le gène SAG1 est capable d'infester et de se répliquer comme une souche sauvage et entraîne la diminution de l'expression de chémokines. Ceci réduit le recrutement et l'activation des cellules inflammatoires (macrophages, cellules dendritiques, B

et T) mais aussi la sécrétion de médiateurs (IFN- γ , TNF- α et INOS) (**Rachinel et coll., 2004**). L'utilisation de souris transgéniques SAG1 a permis d'établir le rôle stratégique de cette protéine dans l'immunité cellulaire (**Seng et coll., 2002**). SAG1 serait un antigène pivot impliqué dans l'induction de la réponse immune en développant une immunité protectrice de type Th-1 durant l'infection.

V.3 Approche vaccinale

Un des buts de la vaccination est d'orienter une réponse T helper appropriée. Chez *T. gondii*, une réponse de type Th-1 est requise, pour qu'il y ait protection. Ainsi une vaccination qui conduirait à une immunité de type Th-1 sera souhaitable (**Bhopale, 2003 b**). Les vaccins de souches atténuées ont été développés pour l'animal mais ne sont pas recommandés pour l'homme (**Buxton et Innes, 1995**). De nombreuses études ont montré qu'il était possible de développer des vaccins contre la toxoplasmose humaine en utilisant des protéines recombinantes ou des peptides très immunogènes et de récentes études ont permis de déterminer les meilleurs candidats (**Bhopale, 2003 b**). De nombreuses études utilisent SAG1. Cette protéine, en association avec des adjuvants ou des vecteurs, peut induire une protection partielle chez la souris et le rat en diminuant le nombre de kystes intracérébraux ou en augmentant le temps de survie des animaux (Tableaux 1A, 1B et 1C). Des peptides spécifiques de SAG1 sont aussi capables d'induire une immunité protectrice (**Darcy et coll., 1992; Godard et coll., 1994; Velge-Roussel et coll., 1997**) (Tableau 1D). **Rachinel et coll. (2004)** montrent qu'une souche déficiente pour le gène SAG1 induit une augmentation du nombre de kystes par rapport à une souche sauvage. Ainsi, jouant un rôle critique dans la protection, SAG1 semble être un bon candidat à la vaccination (**Seng et coll., 2004**).

Tableau 1 : Descriptif des principaux essais de protection vaccinale par SAG1

Tableau 1A. SAG1 recombinante

Vaccin potentiel	Adjuvant	Modèle		Résultats	Réf.
		Immunisation	Infestation		
Antigènes de tachyzoïte dont SAG1	ISCOM	Souris Swiss, 3 doses à 6 sem. d'intervalle, 5 µg	2,5x10 ⁴ tachyzoïtes souche C56, 10 kystes souche C56, 250 oocystes sporulés souche ME49	↗ Survie	Lunden et coll., 1993
SAG1 recombinante/ <i>E.coli</i>	Alun	Souris, 4 doses, 2 sem. d'intervalles, 20 µg SAG1	10 ⁵ tachyzoïtes souche RH, 100 kystes souche SS1119	↗ Survie Immunisation = réponse Th-2. Infestation = réponse Th-1.	Petersen et coll., 1998
SAG1 recombinante / <i>E.coli</i>	IL-12 recombinante	Souris CBA/J, 2 doses à une sem. d'intervalle, 4 µg	20 kystes souche Prugnialud	↗ Kystes intracérébraux de 40 %. Réponse de type Th-2	Letscher-Bru et coll., 1998
SAG1 recombinante/ Baculovirus	ISCOM	Souris, 0.1, 1 et 10 µg	Tachyzoïtes souche ZSI	↗ Survie	Chen et coll., 1999
SAG1 recombinante/ <i>P.pastoris</i>	SBAS1	Cochon d'Inde, 3 doses à 3 sem. d'intervalles, 10 µg	5x10 ⁵ tachyzoïtes souche C56	Protection significative contre transmission materno-fœtale.	Haumont et coll., 2000
Protéine chimérique SAG1/SAG2	Vet L-10	Souris BALB/c, 2 doses à 0 et 2 sem., 10 µg	10 ³ tachyzoïtes souche RH	↗ Survie de 75 %.	Yang et coll., 2004

sem.= semaine

Tableau 1B. SAG1 en association avec un plasmide

Vaccin potentiel	Adjuvant	Modèle		Résultats	Réf.
		Immunisation	Infestation		
Plasmide-SAG1	/	Souris C3H, 2 doses à 0 et 3 sem., 50 µg	10 ⁵ tachyzoïtes souche RH	Protection Avant infestation= Th-1	Nielsen et coll., 1999
		Souris BALB/c, 2 doses à 0 et 3 sem., 50 µg			
Plasmide-SAG1	GM-CSF	Souris C57BL/6, 3 doses à 0, 3 et 6 sem., 50 µg	80 kystes souche Me49	↗ Survie	Angus et coll., 2000
		Rats, 3 doses à 0, 4 et 8 sem., 50µg	10000 oocystes souche VEG	↘ Kystes	
Plasmide-SAG1	IL-2	Souris NIH 3 doses à 3 sem. d'intervalles, 100µg	200 tachyzoïtes souche RH	↗ Survie	Chen et coll., 2002
Plasmide-SAG1 et ROP2	Freund	Souris BALB/c 2 doses à 3 sem. d'intervalles, 12.5 ou 25 µg	10 ⁵ tachyzoïtes souche RH	↗ Survie avec cocktail d'ADN, mort des souris si SAG1. Infestation= réponse Th-1	Fachado et coll., 2003
Plasmide-SAG1	/	BALB/c, 50 µg, 2 doses à 3 sem. d'intervalles	10 ou 20 kystes souche Beverley	↗ Survie ↘ Kystes Avant et après infestation= réponse Th-1.	Couper et coll., 2003

Sem.= Semaine

Tableau 1C. SAG1 purifiée

Vaccin potentiel	Adjuvant	Modèle		Résultats	Réf.
		Immunisation	Infestation		
SAG1 purifiée	Freund	Souris BALB/c, 4, 5µg à J0, J8 et J15	Tachyzoïtes souche C	↗ Mortalité	Kasper et Ware, 1985
SAG1 purifiée	Liposomes	Souris Swiss-Webster, 2 doses à 0 et 14 jours, 1 µg	Tachyzoïtes souche C	↗ Survie	Bülow et coll., 1991
SAG1 purifiée	Quil A	Souris CD1, C57BL/6 et A/J, 2 doses à une semaine d'intervalle 0,5 µg	50 kystes souche P	↗ Survie (CD1: 90%; C57BL/6: 33.3%; A/J: 66.6) ↘ Kystes	Khan et coll., 1991
SAG1 purifiée	Toxine cholérique (TC)	2 doses à 28 jours d'intervalle ou + 1 dose 4 mois plus tard, 10 µg	100 kystes souche 76K	↘ Kystes (85%), réponse anticorps Th-1	Debard et coll., 1996
SAG1 purifiée	Toxine cholérique et entérotoxines mutées	Souris CBA/J, 2 doses à 28 jours d'intervalle, 10 µg	70 kystes souche 76k	↘ Kystes. Avant infestation= réponse Th-1	Bonenfant et coll., 2001

J= Jour

Tableau 1D. Peptides de SAG1

Vaccin potentiel	Adjuvant	Modèle		Résultats	Réf.
		Immunisation	Vaccin potentiel		
Peptide SAG1 (48-67 MAP)	Freund	Souris OF ₁ à J0, 7, 15 et 35, 25 µg peptide	1200 kystes souche 76K	↗ Survie	Darcy et coll., 1992
		Rats Fischer à Jo, 7, 15 et 35, 50 µg	5x10 ⁴ tachyzoïtes souche RH		
Peptides (48-67; 238-256; 279-285)	Freund	Rats Fischer, 3 doses à 1 sem. d'intervalle, 50 µg de 238-256 et 279-285	10 ⁶ tachyzoïtes souche RH	Réponse de type Th-1 pour 279-285 et Th-2 pour 238-256	Godard et coll., 1994
		Rats Fischer, 4 doses à J 0, 7, 18 et 35, 50 µg de 48-67 ou MAP	10 ⁶ tachyzoïtes souche RH	Réponse de type Th-1	
		Rats Fischer, 100 µg peptide 238-256, 4 doses à 1 sem. d'intervalle	1200 kystes souche 76K	Réponse de type Th-2	
Peptide SAG1 (125-165)	Freund	Souris CBA/J, 20 µg, 2 doses à 4 sem. d'intervalles	100 kystes souche 76K	↘ Kystes (35%), Réponse de type Th-1	Velge-Roussel et coll., 1997
		Souris C57BL/6, 20 µg, 2 doses à 4 sem. d'intervalles	10 kystes souche 76K	Pas de protection. Réponse de type Th-2	

sem.= semaine ; J= Jour

VI. Objectifs

Les objectifs de notre travail ont été d'évaluer les propriétés immunogènes et antigéniques de peptides spécifiques d'allèles de la protéine de surface SAG1 de *T. gondii* et les différences observées lors de la présentation de ces peptides au système immunitaire, en modèle humain et murin.

Dans un premier temps, nous avons sélectionné des peptides d'allèles sur SAG1. Nous avons évalué l'immunoréactivité des peptides sur des sérums humains puis testé leurs propriétés protectrices dans un modèle murin. Enfin, nous avons étudié l'impact de ces peptides 1/ sur l'activation et la maturation des cellules dendritiques immatures, 2/ sur la régulation de l'environnement cytokinique des cellules dendritiques immatures, et 3/ sur la régulation des propriétés immunomodulatrices des lymphocytes T au cours de co-culture avec des cellules dendritiques immatures pulsées par ces peptides.

Tableau 2 : Résumé du plan expérimental

Objectif	Protocoles	Paramètres explorés
Sélection de peptides spécifiques d'allèles	<u>Séquencage de souches et étude des profils d'antigénicité de SAG1</u>	
Immunoréactivité des peptides	<u>Etude <i>in vitro</i> d'une collection de sérums humains:</u> positifs et négatifs adultes et enfants	<ul style="list-style-type: none"> • Anticorps anti-peptide SAG1 de type IgG
Protection et réponse immunitaire après immunisation	<u>Etude <i>in vivo</i> chez la souris :</u> Vaccination peptidique Infestation à J 49 Evaluation à la 11 ^{ème} semaine	<ul style="list-style-type: none"> • Anticorps anti-peptide SAG1 (IgG, IgG1 et IgG2a) • Numération des kystes intracérébraux • Parasitémie
Etude de l'effet des peptides dérivés de SAG-1 sur les propriétés immuno-modulatrices des cellules dendritiques humaines immatures	<u>Etude <i>in vitro</i> sur des cellules humaines:</u> Cellules dendritiques immatures Lymphocytes T	<ul style="list-style-type: none"> • Activation et maturation des cellules dendritiques • Environnement cytokinique des cellules dendritiques • Immunorégulation des cellules lymphocytaires T

Matériels et Méthodes

I. Sélection de peptides spécifiques d'allèles

I.1 Souches

Dix neuf souches de *T. gondii*, représentatives des souches de type I, II, III et atypiques ou recombinantes, ont été analysées dans cette étude (Tableau 3). Ces souches sont obtenues à partir de prélèvements pathologiques inoculés par voie intrapéritonéale à des souris Swiss indemnes de toxoplasmose. Quatre semaines après l'infestation, un contrôle sérologique est réalisé pour établir la séroconversion toxoplasmique, preuve de l'infestation par le parasite. Les souris positives sont conservées quelques semaines en vue de l'enkystement des souches, elles sont ensuite euthanasiées et leur cerveau est récupéré. Celui-ci est broyé dans du PBS et déposé sur un gradient de percoll. Après centrifugation, les kystes sont prélevés, lavés et trypsinés provoquant leur éclatement et la libération des bradyzoïtes. Ceux-ci sont mis en culture avec des cellules THP1 (cellules myélomonocytaires humaines).

Au bout de 6 à 7 jours, l'éclatement des cellules libère les tachyzoïtes qui sont recueillis et ré-inoculés à de nouvelles cellules. La souche est ainsi entretenue en culture. Après un délai variable selon les souches, les tachyzoïtes sont recueillis. L'ADN des tachyzoïtes est extrait sur des colonnes QIAmp DNA MiniKit de Qiagen selon les instructions du fabricant ; puis stocké à - 80 °C.

Le typage moléculaire des souches a été effectué dans le cadre du Centre de Ressources Biologiques Toxoplasme et repose sur un typage multilocus utilisant différentes techniques. Un typage par PCR-RFLP est réalisé sur les gènes SAG1 et SAG2 par le laboratoire de Reims ; les enzymes de restriction utilisées sont DdeI sur le gène SAG1, permettant de distinguer les souches de type I ; les enzymes HhaI et Sau3AI sur le gène SAG2. Un typage par microsatellites a été développé par laboratoire de Limoges (**Azjenberg et coll, 2002b**).

Tableau 3 : Souches de *T. gondii*

Souches	Origine	Zymodème	Typage SAG1 et /ou SAG2	Typage microsatellites
RH	USA	I (Z1) Dardé et coll., 1992	I	I ^a
CIBMUQ/HDC	Colombie	?	I ^b	I ^a
TONT	France	Atypique (Z8) Dardé, 1996	I	III ^{*a}
MAS	France	Atypique (Z5) Dardé et coll., 1992	I	Atypique ^a
RMS-1994-LEF	France	?	I ^b	Recombinante III/I ^{*b}
PRU	France	II (Z2) Dardé et coll., 1992	II	II ^a
RMS-1995-ABE	France	?	II ^b	II ^b
RMS-1997-PAR	France	?	III ^b	III ^b
RMS-1999-GUI	France	?	II ^b	II ^b
RMS-1999-BES	France	?	II ^b	II ^b
RMS-2000-GIL	France	?	II ^b	II ^b
RMS-2000-TRA	France	?	II ^b	II ^b
RMS-2000-BAR	France	?	II ^b	II ^b
RMS-2000-WAU	France	?	II ^b	II ^b
RMS-2001-GRA	France	?	II ^b	II ^b
RMS-2001-MAU	France	?	II ^b	Atypique II/I ^{* ou I/III^{*a}}
RUB	Guyane	Atypique (Z6) Dardé et coll., 1998	I ^b	Atypique ^a
GUY-2001-DOS	Guyane	?	I ^b	Atypique ^a
NED	France	III (Z3) Dardé et coll., 1992	III	III ^a

(* indique la présence d'un allèle atypique, ^a Ajzenberg et coll., 2002 a et 2004, ^b Centre de Ressources Biologiques)

I.2 Séquençage de la région codante

Afin d'identifier les sites de polymorphisme présents dans la zone codante de SAG1, nous avons réalisé le typage moléculaire de ce gène sur les 19 souches décrites. Quatre amorces ont été sélectionnées (positions 152-172, 782-802) et (769-789, 1313-1333 respectivement) permettant d'amplifier deux fragments se chevauchant encadrant la zone codante (**Marlé, DEA biomolécules et dynamique cellulaire, 2001**).

primer 1, 5'-CAATGTGCACCTGTAGGAAGC-3',

primer 2, 5'-TCCCTTGATGCAACCGACCA-3',

primer 3, 5'-AACGCAGACGTTTGTGGTCG-3',

primer 4, 5'-CAACGGTAATCACTCACGCG-3'

La PCR est effectuée avec 20 ng d'ADN extrait dans un volume réactionnel final de 50 µl. Brièvement, le mélange réactionnel contient 10 mM de Tris-HCl, 50 mM de KCl, 2mM de MgCl₂, 200 µM de dNTP's, 1µM de chaque amorce et 1,25 U de Taq polymerase. L'amplification se décompose en trois étapes de 30 secondes répétées 40 fois: dénaturation à 94°C, hybridation à 60°C et élongation à 72°C. Après amplification par PCR de la région codante, les amplifiats sont analysés sur gel d'agarose à 2%, puis purifiés et séquencés. Les séquences sont alignées en utilisant le logiciel ClustalW (ebi.ac.uk).

I.3 Peptides

Quatre peptides ont été synthétisés : les 2 peptides spécifiques d'allèles, le peptide 238-256/I décrit par **Godard et coll. (1994)** et un peptide irrelevant. La nomenclature adoptée dans ce travail suit celle proposée par **Kong et coll. (2003)**.

La synthèse des peptides est réalisée par la chimie Fmoc (fluoren-9-ylmethoxycarbonyl) en phase solide (sur résine). Les peptides sont clivés de la résine et déprotégés avec de l'acide trifluoroacétique. Les culots sont ensuite dissous dans de l'acide acétique et lyophilisés. Chaque peptide est soumis à un contrôle de qualité par HPLC (avec un degré de pureté > 95%) et spectrométrie de masse à électrospray d'ionisation (unité UMR CNRS 6013 du Pr. Laronze, Reims, France.). Les peptides sont aliquotés et conservés à -80°C.

Le couplage à la BSA a été effectué par Qbiogène (France) en utilisant deux agents de liaison différents: la glutaraldehyde pour les peptides spécifiques d'allèles; le MBS (M-maleimidobenzoil-*N*-hydroxysuccinimide ester) pour le peptide 238-256/I. Les peptides couplés sont aliquotés et stockés à -20°C.

II. Immunoréactivité des peptides

II.1 Sérums humains

Cette étude a porté sur 151 sérums humains. Pour chaque sérum, un test sérologique détectant les anticorps IgG, IgM et IgGA anti-*T. gondii* a été effectué au laboratoire de Parasitologie de Reims afin de déterminer le statut sérologique du patient vis-à-vis du toxoplasme. La séropositivité ou séronégativité se réfère à la présence ou à l'absence, respectivement, de ces anticorps dans les sérums.

Nous avons analysé 44 sérums d'adultes présentant une toxoplasmose aiguë (Immunoglobulines G, M et/ou A positives, n=30) ou chronique (IgG positives, IgM négatives,

n=14) et 67 sérums d'enfants avec une toxoplasmose congénitale (présence de lésions toxoplasmiques et/ou persistance d'anticorps anti-*T. gondii* après l'âge d'un an). Parmi ces échantillons, 25 proviennent de 13 enfants atteints de toxoplasmose congénitale dont le type de la souche responsable de l'infection est connu. Le type a été déterminé par RFLP sur les gènes SAG1 et SAG2 (1 type I et 12 type II). Parallèlement nous avons étudié 40 sérums séronégatifs. Un même sérum positif et négatif (analysé en duplicate) a servi de contrôle.

II.2 Quantification des anticorps spécifiques peptides (ELISA indirecte)

Les peptides couplés à la BSA sont incubés dans des plaques de 96 puits (nunc maxisorp immuno plates, Danemark) à une concentration de 10 µg /mL dans 0,1 M de carbonate bicarbonate de Sodium (pH 9,5) pendant 2 heures à 37°C (100 µl par puits). Après un lavage au PBS (pH 7,2), les plaques sont saturées une nuit à température ambiante avec 100 µl de tampon de saturation (5% de caséine, PBS, 2% d'IgEpal, 0,1% de Tween 20 et 20% de sérum de veau). Trois lavages sont effectués avec une solution de PBS et de Tween 20 à 0,1%. Les échantillons dilués au 1/100 dans une solution tampon (1% de caséine, PBS, 2% d'IgEpal, 0,1% de Tween et 20% de sérum de veau) sont incubés pendant 1 heure à 37°C. Après 5 lavages, l'anti-immunoglobuline humaine (IgG) de chèvre marquée à la peroxydase (Paris-Biotech, France), diluée au 1/1000, est ajoutée dans chaque puits et incubée pendant 1 heure à 37°C. Les plaques sont une nouvelle fois lavées cinq fois et incubées 10 min en présence d'un substrat (OPD ou O-Phenyldiamine de Sigma) à l'obscurité. La réaction est stoppée avec de l'HCl 1N. La densité optique (D.O.) est lue à 490 nm. Chaque sérum est analysé en duplicate.

Un index IgG est calculé pour chaque échantillon : D.O. de l'échantillon / 0.4 (moyenne des D.O. du sérum contrôle positif – moyenne des D.O. du sérum contrôle négatif). Un sérum est considéré positif lorsque son index IgG est supérieur à la moyenne des index IgG des sérums négatifs (n=40) + 3 déviations standards (SD).

III. Protection et réponse immune après immunisation

III.1 Protocole expérimental

1. Souche virulente

Nous avons étudié, dans un premier temps le potentiel protecteur des peptides vis à vis de la souche RH. Pour cela, nous avons immunisé 4 groupes de 4 souris Swiss avec 200 µl d'une émulsion contenant de l'adjuvant de Freund (100 µl) et respectivement 0 µg, 10 µg, 20 µg ou 40 µg du peptide 251-265/I à un ratio de 1/1. Un groupe de souris non immunisées est utilisé comme contrôle. Les souris ont été immunisées par injection sous cutanée deux fois à 4 semaines d'intervalles. La première injection contient un mélange du peptide immunogène et d'adjuvant complet de Freund (ACF). L'injection suivante a été réalisée en présence d'adjuvant incomplet de Freund (AIF). Après deux semaines, chaque souris est inoculée par voie intrapéritonéale (afin de s'assurer de la dose infestante) avec 10^3 tachyzoïtes de la souche RH.

2. Souche chronique

Nous avons ensuite évalué le potentiel protecteur des peptides vis à vis d'une souche de type II, la souche PRU non virulente et kystogène. Le protocole d'immunisation (Tableau 4) a inclus cinq groupes de 10 souris Swiss. Un groupe de souris non immunisées est utilisé comme contrôle. Quatre groupes de souris ont été immunisés avec les 3 peptides de SAG1 ou avec l'adjuvant seul. Chaque souris reçoit trois injections par voie sous cutanée (sous 200 µl à une concentration de 20 µg/mL de peptides), administrées à quatre et deux semaines d'intervalles. Comme précédemment, la première injection est effectuée avec l'ACF et les rappels avec l'AIF. Une semaine après la dernière immunisation, toutes les souris ont été infestées par voie intrapéritonéale avec 10^4 tachyzoïtes de la souche PRU. Trente jours post-infection, les

cerveaux sont broyés et homogénéisés dans 2 mL de PBS ; les kystes intracérébraux ont été quantifiés.

Tableau 4: Programme d'immunisation et d'infestation par une souche chronique.

SEMAINES	ETAPES	LOTS SOURIS
0	Absence d'immunisation	1 groupe de 10 souris
0	1ère immunisation voie sous cutanée (peptides + ACF ou ACF seul)	4 groupes de 10 souris 20 µg /souris
4	2ème immunisation voie sous cutanée (peptides + AIF ou AIF seul)	4 groupes de 10 souris: 20 µg /souris
6	3ème immunisation voie sous cutanée (peptides + AIF ou AIF seul)	4 groupes de 10 souris: 20 µg /souris
7	Prélèvement des sérums et test des sérums en ELISA	5 groupes de 10 souris (IgG totaux, IgG1 et IgG2a)
7	Infestation par voie intrapéritonéale	5 groupes de 10 souris 10 ⁴ tachyzoïtes/souris
11	Prélèvement et test des sérums en ELISA	5 groupes de 10 souris (IgG totaux, IgG1 et IgG2a)
11	Sacrifice de toutes les souris	Prélèvement des cerveaux

III.2 Techniques utilisées

1 Quantification des anticorps spécifiques peptides (ELISA indirecte)

Nous avons collecté les sérums de chaque souris (prélèvement à la base de la queue) avant l'infestation (à S7) et avant le sacrifice (à S11). L'immunoréactivité de chaque souris vis à vis des peptides a été évaluée en effectuant un test immunoenzymatique (ELISA indirecte). Pour le dosage des IgG totaux, les seules modifications apportées sont les suivantes : utilisation d'une anti-immunoglobuline murine marquée à la peroxydase (Biorad, France) et de l'urée à 1,5 M dans le tampon de dilution de l'anticorps. En outre, le dosage des sous classes d'IgG (IgG1 et IgG2a), comprend une incubation d'une nuit à 4°C de la solution peptidique (10 µg /mL) suivie d'une saturation de 30 minutes à 37°C avec une solution bloquante (20% de sérum de veau fœtal dans du PBS).

2. Détection des Anticorps par Western blot

L'antigène ou TSA (*T. gondii* sonicate antigen) est extrait à partir de tachyzoïtes de la souche RH obtenus sur souris. Après trois cycles de congélation/ décongélation successifs à -80°C, les toxoplasmes sont traités au formol puis soniqués. A l'issue de cette dernière étape, l'antigène est congelé à -80°C jusqu'à utilisation. L'antigène soluble, contenant toutes les protéines solubles dont SAG1, est dilué dans du SDS à 2,5 %. L'antigène, et les poids moléculaires (kaléidoscope et kit biotynilé Biorad) sont déposés sous 1 µl sur gel à gradient 10-15 (Amersham). La migration est faite sur Phast system (Pharmacia, France) pendant environ 30 minutes. Après séparation des protéines contenues dans l'antigène en gel d'acrylamide, un transfert actif est effectué sur membrane de nitrocellulose. Pour cela, la nitrocellulose est prise en sandwich entre du papier Wattman imprégné de tampon anodique (Tris 25 mmol/l, glycine 192 mmol/l, méthanol 20 %) et de tampon cathodique (Tris 25 mmol/l, glycine 192 mmol/l, SDS 0,1 %). Après le transfert sous courant électrique, la membrane de nitrocellulose est

saturée dans une solution de Maléate 1X-Caséine 0,5% durant quelques heures. La membrane est incubée avec les sérums dilués au 1/250° (sérums contrôle ou sérums des souris immunisées). L'Anticorps monoclonal anti-SAG1 (GII9, Argène Biosoft, France) est utilisé à la dilution 1/3000°. Les membranes sont ensuite lavées avec un tampon de lavage (maléate 1X et Tween 20 0,1%). La membrane est ensuite incubée avec l'anticorps secondaire anti-IgG, IgG1 ou IgG2a de souris marqué à la peroxydase dilué au 1/2000° (Biorad, France). Le marqueur enzymatique est révélé à l'aide de son substrat et d'un chromogène révélateur de la réaction enzymatique.

3. Détection des Anticorps par Immunofluorescence

Dans un tube conique, nous déposons 100 µl contenant 5000 tachyzoïtes de la souche RH (type I) et de la souche PRU (type II). Les tachyzoïtes sont incubés 60 minutes à 37 °C en présence des sérums dilués au 1/100. Après centrifugation (5 minutes à 2000 tr/min), le culot est repris par 1 mL de PBS pH 7,2. Sur le culot obtenu après une seconde centrifugation (5 minutes à 2000 tr/min), nous ajoutons 200 µl d'une solution contenant un anticorps de chèvre anti-immunoglobulines de souris (IgG totaux) marqué à la fluorescéine (Paris, France) et le bleu Evans dilués au 1/100°. L'ensemble est incubé pendant 60 minutes à 37°C. Après lavage, le culot est mis en suspension dans 100 µl de PBS. Une goutte de 20 µl est déposée et séchée à 37°C ; une goutte de Fluoprep est ensuite déposée pour observation au microscope.

L'observation a été réalisée par microscopie confocale.

4. Quantification de la charge parasitaire

4.1 Analyse microscopique

Trente jours post-infection, les cerveaux ont été broyés et homogénéisés dans 2 mL de PBS ; les kystes intracérébraux ont été quantifiés en microscopie optique : lecture de 5 lames à partir d'un même homogénéisat (100µl analysés au total). Une moyenne du nombre de kystes obtenus pour chaque lame est réalisée pour chaque groupe.

4.2 Analyse par PCR quantitative

La charge parasitaire est réalisée par PCR quantitative « en temps réel » sur I Cycler (BioRad, France) avec une sonde Taqman spécifique. L'ADN est extrait des kystes broyés sur des colonnes QIAmp DNA MiniKit (Qiagen) selon les instructions du fabricant. Nous avons choisi d'amplifier une portion de 98 pb du gène B1, gène répété 35 fois, avec les amorces décrites par **Lin et coll. (2000)** : Toxo-F 5'-TCCCCTCTGCTGGCGAAAAGT-3' et Toxo-R 5'-AGCGTTCGTGGTCAACTATCG ATTG-3'. L'ADN extrait (5µl) est ajouté au « mix » de PCR (sous un volume final de 25µl) contenant : 0.75 U de Taq DNA polymerase (Platinum Biorad), 20 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 200 µM dGTP/ATP/CTP, 400 µM dUTP, 0.5 U UNG, 12.5 pmol de chaque amorce et 5 pmol d'une sonde Taqman fluorescente (5'FAM-TCTGTGCAACTTTGGTGTAT TCGCAG-3'TAMRA). Les amplifications sont effectuées sur 2 puits d'amplification pour chaque échantillon : un cycle d'activation de l'UNG (3 minutes à 50°C), une dénaturation initiale avec activation de la Taq polymerase (3 minutes 30 à 95°C) suivie de 45 cycles de PCR (15 seconde à 95°C et 1 minute à 60°C).

Une courbe standard est construite par amplification d'une gamme de tachyzoïtes de *T. gondii* s'échelonnant de 1 à 1000 parasites. Les valeurs des cycles seuils (Ct) correspondent au nombre de cycles à partir duquel une fluorescence est décelée au-delà de la ligne de base (threshold), signifiant la présence d'ADN toxoplasmique dans l'échantillon. La valeur du Ct est

d'autant plus basse qu'il y a d'ADN cible. Une réaction PCR est positive lorsque les 2 puits sont positifs (valeur du Ct définie); elle est considérée douteuse lorsqu'un puits seulement est amplifié, et négative pour aucun puits amplifié. Comme la courbe de PCR est réalisée à partir d'une gamme de tachyzoïtes, nous ne pouvons quantifier les échantillons en équivalent bradyzoïtes.

IV. Effets des peptides de SAG1 sur les propriétés immunomodulatrices des cellules dendritiques humaines immatures

IV.1 Isolement des monocytes humains et des lymphocytes T CD4⁺

Les monocytes et les lymphocytes humains ont été obtenus à partir du sang veineux périphérique de donneurs volontaires sains, séronégatifs pour les virus de l'immunodéficience humaine, de l'hépatite B et de l'hépatite C. La fraction monocyttaire et lymphocytaire du sang périphérique humain nous a été fournie par l'Etablissement de Transfusion Sanguine du Centre Hospitalier de Reims (Pr N'Guyen). Elles sont obtenues par élutriation à contre-courant (élutriateur J6-MC Beckman) qui permet de séparer stérilement et sans contamination par des endotoxines, les différentes populations cellulaires sanguines en fonction de leur taille et selon un protocole décrit en 1992 (**Lopez et coll., 1992**). Les cellules T CD4⁺ ont été isolées de la fraction lymphocytaire d'élutriation par sélection positive au moyen de billes magnétiques sur lesquelles ont été fixées un anticorps monoclonal de souris anti-CD4 humain (Dynal, France). Après sélection, les cellules T CD4⁺ sont cultivées pendant 24 heures dans du milieu RPMI 1640 contenant 10% de sérum AB et ceci afin de permettre la séparation entre les billes et les cellules. Les cellules T CD4⁺ ont alors été congelées dans l'azote liquide jusqu'à leur utilisation dans des tests de co-culture avec des cellules dendritiques pulsées par les peptides d'intérêts.

Pour les expériences que nous avons réalisées, la pureté de la fraction monocyttaire et des cellules T CD4⁺ a toujours été supérieure à 98% (analyse par cytométrie en flux) avec une viabilité cellulaire de 95% mise en évidence par la technique d'exclusion au bleu trypan. Pour chacun des donneurs, un test sérologique a été systématiquement effectué afin de définir leur statut immunologique vis-à-vis du toxoplasme. La séropositivité ou la séronégativité se réfère à la présence ou l'absence d'anticorps spécifiques de *T. gondii*. Dans notre étude, nous avons utilisé des donneurs séropositifs pour le toxoplasme.

IV.2 Genèse de cellules dendritiques à partir des monocytes sanguins

Les cellules dendritiques humaines ont été obtenues par culture des monocytes dans des puits en Téflon (Merck, France) afin d'éviter tout phénomène d'adhérence. Les monocytes ont été cultivés à raison de 10⁶ cellules/mL dans un milieu de culture RPMI 1640 contenant 10% de sérum de veau fœtal (SVF), 1 mM de L-Glutamine, 1 mM de Pénicilline/Streptomycine, 500 U/mL d'IL-4 recombinante et 800 U/mL de GM-CSF recombinant (R&D Systems, France). La culture a été réalisée à 37°C dans une atmosphère humide contenant 5% de CO₂. Après 5 jours de culture, les cellules dendritiques acquièrent les caractéristiques phénotypiques et morphologiques des cellules dendritiques immatures. La maturation des cellules dendritiques, en dehors de l'activation par les peptides d'intérêts, a été obtenue en cultivant les cellules dendritiques immatures pendant 48 heures en présence de GM-CSF recombinant, d'IL-4 recombinante et de 1 µg/mL de LPS d'*E. Coli* O111:B4 (Sigma, France)

IV.3 Protocole expérimental d'activation des cellules dendritiques immatures par les peptides spécifiques d'allèles

L'étude des caractéristiques phénotypiques des cellules dendritiques immatures activées par les peptides a été réalisée par cytométrie en flux 48 heures après activation peptidique de 1×10^6 cellules dendritiques immatures cultivées dans des puits en Téflon dans du milieu RPMI 1640 contenant 10% de SVF, 1 mM de L-Glutamine, 1 mM de Pénicilline/Streptomycine, 500 U/mL d'IL-4 recombinante et 800 U/mL de GM-CSF recombinant. Les peptides ont été utilisés à trois concentrations différentes : 10^{-2} µg/mL, 10^{-1} µg/mL et 1 µg/mL. Le LPS *E. Coli* a été utilisé comme contrôle positif de maturation à la concentration de 1 µg/mL. L'étude de la production de cytokines par les cellules dendritiques immatures a été réalisée 6 heures après activation par ces peptides au niveau de l'expression des ARNm (RT-PCR) et au niveau de la sécrétion de la protéine dans les surnageants de culture. Le LPS et un peptide irrelevant ont été utilisés respectivement comme contrôle positif et négatif à la concentration de 1 µg/mL.

Les préparations de peptides utilisées dans toutes nos expériences ont un taux indétectable d'endotoxines (taux < 0.015 EU/mL) déterminé par le test au Limulus Amebocyte (E-TOXATE reagent, Sigma).

IV.4 Immunophénotypage membranaire et intracellulaire des monocytes, des cellules dendritiques et des lymphocytes par cytométrie en flux

1. Les anticorps monoclonaux utilisés

Pour notre étude, neuf anticorps monoclonaux ont été utilisés (BD Pharmingen, France). Pour les marquages membranaires, les anticorps monoclonaux murins suivants ont été utilisés : anticorps anti-CD14 (clone M5E2, IgG2a), anti-CD3 (clone SK7, IgG1) humains marqués à l'isothiocyanate de fluoresceïne (FITC), les anticorps anti-CD4 (clone RPA-T4, IgG1), anti-CD80 (clone L307.4, IgG1), anti-CD83 (clone HB15e, IgG1) et anti-CD86 (clone IT2.2, IgG2b) humains marqués à la rhodamine phycoerythrine (RPE), l'anticorps anti-CD1a (clone

HI149, IgG1) marqué à l'allophycocyanine (APC). Pour les marquages intracytoplasmiques, les anticorps anti-IL-4 (MP4-25D2, IgG1) et anti-IFN- γ (clone B27, IgG1) humains marqués à l'allophycocyanine ont été utilisés. Les concentrations optimales d'utilisation des différents anticorps ont été déterminées par des expériences préliminaires. A l'exception des anticorps anti-IL-4 et anti-IFN- γ utilisés à la concentration de 2.5 $\mu\text{g/mL}$, les anticorps utilisés dans notre étude l'ont été à la concentration de 1 $\mu\text{g/mL}$. Les marquages non spécifiques ont été appréciés par l'utilisation d'isotypes contrôles : IgG2a-FITC, IgG1-FITC, IgG1-RPE, IgG2b-RPE, IgG1-APC.

2. Marquage membranaire des monocytes et des cellules dendritiques

Le marqueur CD14 étant exclusivement exprimé par les monocytes, le marquage par l'anticorps anti-CD14 FITC nous permet de vérifier la présence ou l'absence de ces cellules lors de l'obtention des cellules dendritiques qui n'expriment pas ce marqueur. Les marqueurs CD80 et CD86 sont des molécules de co-stimulation qui sont fortement exprimées lors de la maturation des cellules dendritiques. Le marqueur CD83 est le marqueur d'activation de choix présent à la surface des cellules dendritiques matures. La molécule CD1a est fortement exprimée à la surface des cellules dendritiques immatures et matures. Les anticorps dirigés contre ces différents marqueurs permettent de phénotyper et de différencier les cellules dendritiques matures et immatures.

Pour les marquages, 10^6 cellules ont été incubées pendant 20 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière avec les anticorps d'intérêts aux concentrations précisées ci-dessus. Après incubation, les cellules sont lavées deux fois en présence de PBS 1X par centrifugation pendant 10 minutes à 400g et à + 4°C puis fixées dans une solution de paraformaldéhyde à 1% dans du PBS 1X, pH 7,2.

3. Marquage membranaire des lymphocytes T CD4⁺

Afin d'isoler la population lymphocytaire T CD4⁺ lors des expériences de co-culture en présence de cellules dendritiques, nous avons réalisé un double marquage en présence de l'anticorps monoclonal anti-CD3 FITC et de l'anticorps monoclonal anti-CD4 RPE. Le marqueur membranaire CD3 étant exclusivement exprimé sur les lymphocytes T, le marquage par l'anticorps anti-CD3 nous a permis de sélectionner l'ensemble des lymphocytes T et d'exclure les cellules dendritiques. Le marquage par l'anticorps anti-CD4 nous a alors permis de sélectionner au sein des lymphocytes T, la population lymphocytaire T CD4⁺ et d'exclure les lymphocytes exprimant le marqueur de surface CD8⁺.

Pour réaliser ce double marquage membranaire, 2 x 10⁶ cellules de la co-culture ont été incubées simultanément avec 1 µg/mL d'anticorps monoclonaux anti-CD3 et anti-CD4. Après incubation de 30 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière, les cellules sont lavées deux fois en présence de PBS 1X par centrifugation pendant 10 minutes à 400g et à + 4°C puis fixées dans une solution de paraformaldéhyde à 1% dans du PBS 1X, pH 7,2.

4. Marquage intracytoplasmique de l'IL-4 et de l'IFN-γ dans les populations lymphocytaires T CD4⁺

4.1. Perméabilisation cellulaire

Le culot cellulaire obtenu après le marquage membranaire est soumis à une étape de perméabilisation avant le marquage intracellulaire proprement dit. Cependant, afin d'optimiser la perméabilisation, les cellules sont préalablement incubées avec 2 mL d'une solution FACS lysing 1X (BD Pharmingen, France). Cette étape permet la fixation des épitopes membranaires et prépare les cellules pour la perméabilisation. Après 10 minutes d'incubation, les cellules sont lavées deux fois en PBS 1X par centrifugation pendant 10 minutes à 400g et à +4°C. Le culot cellulaire est ensuite mis en présence de 500 µl d'une solution FACS permeabilizing 1X (BD Pharmingen, France) pendant 10 minutes. Après deux lavages dans du PBS 1X, le culot cellulaire peut être marqué avec les anticorps dirigés contre les cytokines d'intérêts.

4.2 Marquage intracytoplasmique

Le culot cellulaire perméabilisé est mis en contact avec 2.5 µg/mL de l'anticorps monoclonal anti-IL-10 ou anti-IFN-γ marqué à l'APC. Après une incubation de 20 minutes les cellules sont lavées deux fois en PBS 1X et le culot cellulaire est repris dans 500 µl d'une solution de paraformaldéhyde (PFA) à 1% dans du PBS 1X.

5. Analyse par cytométrie en flux

Pour les monocytes, les cellules dendritiques et les lymphocytes humains T CD4⁺, une analyse par cytométrie en flux trois couleurs a été réalisée au moyen d'un cytomètre en flux FACSCalibur (BDBiosciences, France). Les monocytes humains et les cellules dendritiques humaines ont été identifiés sur la base de leur caractéristique de taille (FSC) et de complexité (SSC), puis sur la présence ou l'absence à la surface cellulaire des marqueurs CD14 et CD1a afin de distinguer les deux populations dans un même échantillon (monocytes : CD14⁺⁺⁺CD1a⁻, cellules dendritiques : CD14⁻CD1a⁺⁺⁺). Pour les expériences réalisées en co-culture, les cellules T CD4⁺ ont été distinguées des cellules dendritiques en réalisant une fenêtre sur les cellules exprimant à la fois le marqueur CD3 et le marqueur CD4. L'acquisition des données a été réalisée sur un minimum de 10000 évènements et l'analyse des données a été réalisée en utilisant le logiciel d'analyse CellQUEST (BDBiosciences, France).

IV.5 Analyse du niveau d'expression des ARNm codant pour les cytokines par technique de RT-PCR

1. Extraction des ARN totaux

Les ARN sont extraits sur des colonnes RNeasy miniKit (Qiagen, France) à partir de culots cellulaires de 1×10^6 cellules dendritiques immatures traitées ou non par différents inducteurs. Après extraction, les ARN sont repris dans 35 μ l d'eau RNase free.

2. Quantification des ARN

La quantité d'ARN extraite est calculée à partir d'une lecture spectrophotométrique à 260 et 280 nm (Spectrophotomètre GeneQuant II – Pharmacia Biotech). Le rapport des absorptions à 260 nm (A260) et à 280 nm (A280) renseigne sur la pureté des préparations et la contamination protéique éventuelle. Un échantillon d'ARN est considéré comme exploitable lorsque le rapport A260/A280 est compris entre 1.8 et 2.1. Une absorbance d'une unité à 260 nm correspond environ à une concentration de 40 μ g/mL d'ARN.

3. Synthèse des ADN complémentaires (ADNc) et PCR

Avant transcriptase inverse, les ARN extraits subissent un traitement à la DNASE (Invitrogen) pour éliminer d'éventuelles contaminations d'ADN. La transcriptase inverse est réalisée par l'enzyme transcriptase inverse (Superscript II, Invitrogen) en présence d'amorces (oligo-dT à 500 μ g/mL) et de nucléotides (dNTP à 10 mM). Les oligo-dT permettent de transcrire uniquement les ARNm. La transcriptase inverse est effectuée sur 10 μ l d'ARN extraits dans un volume réactionnel de 18 μ l. La transcription est réalisée à 42°C pendant 45 minutes et arrêtée par un chauffage à 70°C pendant 15 minutes. L'ADNc est ensuite conservé à -20°C. Les PCR sont effectuées avec 2 μ l d'ADNc dans un volume réactionnel final de 50 μ l. Le mélange réactionnel contient 200 mM de Tris-HCl, 50 mM de KCl, 2mM de MgCl₂, 200 μ M de dNTP's, 0,5 pmol de chaque amorce, 1,25 U de Taq polymérase. L'amplification se

décompose en trois étapes de 60 secondes répétées 40 fois: dénaturation à 94°C, hybridation à une température variable suivant le gène et élongation à 72 °C. Les amplifiats sont analysés sur gel d'agarose à 2%. Les fragments de gènes amplifiés ont une longueur respective de 443, 702, 639, 350 et 563 paires de bases pour le gène de la β actine, du TNF- α , de l'IL-6, de l'IL-12 et de l'IL-10 (Tableau 5). Les produits de PCR pour chacune des cytokines sont analysés comparativement à la quantité du gène ubiquitaire représenté par la β -actine et détecté dans le même échantillon d'analyse. La linéarité d'amplification pour les cytokines et la β -actine se situe entre 28 et 42 cycles et la linéarité d'amplification relative vis-à-vis de dilutions d'ADNc se situe entre 1/5 et 1/160^{ème} pour le TNF- α et entre 1/10 et 1/160^{ème} pour l'IL-12, l'IL-6, l'IL-10 et la β -actine.

Tableau 5 : Conditions de PCR

Cibles	Séquences	Température	Taille
IL-12	F: 5'-CCAAGAAGCTGTCAGCTGAAG-3' R: 5'-TGGGTCTATTCCGTTGTGTC-3'	62°C	350 pb
TNF α	F: 5'-ATGAGCACTGAAAGCATGATC-3' R: 5'-TCACAGGGCAATGATCCCAAAGTAGACCTGCC-3'	62°C	702 pb
IL-6	F: 5'-ATGAACTCCTTCTCCACAAGC-3' R: 5'-CTACATTTGCCGAAGAGCCCTCAGGCTGGA-3'	62°C	639 pb
IL-10	F: 5'-ATC AAG GCG CAT GTG AAC TC-3' R: 5'-AGA GCC CCA GAT CCG ATT TT-3'	58°C	563 pb
β-Actine	F: 5'-TGCTATCCAGGCTGTGCTA-3' R: 5'- ATGGAGATTGAAGGTAGTTT-3'	58°C	443 pb

IV.6 Dosage immuno-enzymatique des cytokines

Le dosage de l'IL-12, du TNF- α , de l'IL-6 et de l'IL-10 dans les surnageants de culture de cellules dendritiques immatures non traitées ou traitées par le LPS, le peptide irrelevant, un extrait soluble de *T. gondii*, ou les peptides spécifiques d'allèles, a été réalisé par une technique immuno-enzymatique spécifique et quantitative de type ELISA (R&D Systems, France). Les différentes cytokines ont été dosées dans les surnageants de culture 6 heures après activation par les différents inducteurs. La spécificité du dosage est liée à l'utilisation d'anticorps monoclonaux spécifiques des différentes cytokines à doser. La quantification est rendue possible par l'utilisation de cytokines recombinantes de concentrations connues. La sensibilité de chacun des kits ELISA utilisés est respectivement de 3,7 pg/mL, 2,5 pg /mL, 0,70 pg/mL, et 3,9 pg/mL pour l'IL-12, le TNF- α , l'IL-6 et l'IL-10 (données du manufacturier).

IV.7 Présentation d'antigène et réaction de prolifération lymphocytaire

Pour les expériences de présentation d'antigène, les cellules dendritiques immatures ont été mises en culture dans les puits d'une plaque 96 puits à raison de 10^3 à 10^4 cellules par puits dans du milieu RPMI 1640 contenant 10% de SVF, 1 mM de L-Glutamine, 1 mM de Pénicilline/Streptomycine, 500 U/mL d'IL-4 Rec. et 800 U/mL de GM-CSF rec., et pulsées pendant 48 heures avec 10 μ g/mL de toxine tétanique ou 1 μ g/mL de LPS utilisés comme témoin positif d'expérience, ou 1 μ g/mL des peptides d'intérêt. Le pulse des cellules dendritiques immatures avec du PBS a constitué le témoin négatif d'expérience. Après la période d'incubation, le milieu de culture est éliminé et les cellules sont traitées avec 50 μ g/mL de mitomycine C (Sigma, France) pendant 45 minutes à 37°C avant d'être lavées trois fois en PBS. Les lymphocytes autologues T CD4⁺ à la concentration de 10^5 cellules par puits sont alors ajoutés aux cellules dendritiques et le mélange cellulaire cocultivé pendant 6 jours. Pendant les 20 dernières heures, 0,5 μ Ci de thymidine tritiée sont ajoutés dans les différents puits de la co-

culture. La quantité de radioactivité incorporée dans l'ADN des lymphocytes T CD4⁺ est mesurée au moyen d'un compteur à scintillation liquide (Top Count, Packard). Chaque essai est réalisé en quadruplicate et les résultats, corrigés des taux d'incorporation spontanés de thymidine tritiée par les lymphocytes T CD4⁺, sont exprimés en coup par minute.

IV.8 Co-culture et production de cytokines par les lymphocytes

Pour les expériences étudiant la production de cytokines par les lymphocytes T CD4⁺ en co-culture, les cellules dendritiques immatures ont été mises en culture dans des puits en téflon à raison de 10⁶ cellules/mL dans du milieu RPMI 1640 contenant 10% de SVF, 1 mM de L-Glutamine, 1 mM de Pénicilline/Streptomycine, 500 U/mL d'IL-4 recombinante et 800 U/mL de GM-CSF recombinant et traitées pendant 6 heures avec du PBS ou avec 1 µg/mL des peptides d'intérêts. Après la période d'incubation, les lymphocytes autologues T CD4⁺ à la concentration de 10⁷ cellules par puits sont ajoutés aux cellules dendritiques et le mélange cellulaire cocultivé pendant 24 heures avant analyse par cytométrie en flux du niveau d'expression intracellulaire d'IL-4 et d'IFN-γ par les lymphocytes T CD4⁺. Pour certaines expériences, le traitement des cellules dendritiques immatures avec le peptide représentant l'allèle 1 a été réalisé en présence d'un anticorps monoclonal anti-IL4 (5 µg/mL) et celui des cellules dendritiques immatures avec le peptide représentant l'allèle 2 en présence d'un anticorps monoclonal anti-IL-12 (5 µg/mL).

V. Analyse statistique

Les groupes expérimentaux ont été comparés par analyse de la variance (ANOVA), par le test de Wilcoxon ou par le test *t* de Student. Les données sont significatives quand *p* est inférieur ou égal à 0,05.

Résultats

I. Sélection de peptides antigéniques

Après séquençage de la zone codante du gène SAG1 de 19 souches et alignement des séquences obtenues, nous avons identifié 19 sites de polymorphisme (**Marlé, DEA biomolécules et dynamique cellulaire, 2001**).

Parmi eux, 15 étaient déjà publiés (**Bülow et Boothroyd, 1991; Sibley et Boothroyd, 1992; Rinder et coll., 1995; Windeck et Gross, 1996, Miller et coll., 2004**). Des travaux (**Alix, 1999**) menés en relation avec notre équipe, avaient permis de déterminer les épitopes linéaires de SAG1 les plus immunogènes. Ces épitopes ont été choisis en combinant des paramètres tels que l'hydrophobicité, la flexibilité, la probabilité d'être en surface ou encore la conformation en coude. Les zones de polymorphisme ont été comparées aux zones "d'efficacité antigénique maximale" prédites par cet algorithme (Figure 6). Ainsi nous avons sélectionné deux peptides de 15 AA : 251-265/I (TENPWQGNASSDKGA) et 251-265/II-III (SENPWQGNASSDNGA), potentiellement antigéniques, représentatifs respectivement des souches de type I/Atypiques/Recombinantes et des souches de type II/III (Tableau 6). Leur séquence est identique exceptée pour ces 2 AA (Thr vs Ser et Lys vs Asn). Ils se situent entre le décapeptide n°1 (256-265) prédit comme le plus antigénique (**Alix, 1999**) et le n°6 (244-253). Dans notre étude nous avons inclus deux autres peptides : un décrit dans la littérature par **Godard et coll. (1994)** : 238-256/I (CNEKSFKDILPKLTENPWQ; 238-256) (Tableau 6) et un peptide irrelevant : PI (PNSADNEWGSGSNQA) obtenu de façon aléatoire à partir de la séquence du peptide 251-265/I.

1	11	21	31	41	51
1 MSVSLHHFII	SSGFL T SMFP	KAVRRAVTAG	VFAAPTLMSF	LRCGVMASDP	PLVANQVVTC
61 PDKKSTAAVI	LTPTENHFTL	KCPKTALTEP	PTLAYS PN RQ	ICPAGTTSSC	TSKAVTLSSL
121 IPEAEDSWWT	GDSASLDTAG	IKLTVPIEKF	PVTTQTFVVG	CIKGDDAQSC	MVTVTVQARA
181 SSVVNNVARC	SYGAD S TLGP	VKLSAEGPTT	MTLVCGKDG V	KVPQDNNQYC	SGTTLTGCNE
241 KSFKDILPKL	TENPWQGNAS	SDKGA TLTI K	KEAFPAESKS	VIIGCTGGSP	EKHHCTV K LE
301 FAGAAGSAKS	A AGTASHVSI	FAMV I GLIGS	IAACVA		

A

1	11	21	31	41	51
1 MSVSLHHFII	SSGFL A SMFP	KAVRRAVTAG	VFAAPTLMSF	LRCGVMASDP	PLVANQVVTC
61 PDKKSTAAVI	LTPTENHFTL	KCPKTALTEP	PTLAYS PN RQ	ICPAGTTSSC	TSKAVTLSSL
121 IPEAEDSWWT	GDSASLDTAG	IKLTVPIEKF	PVTTQTFVVG	CIKGDDAQSC	MVTVTVQARA
181 SSVVNNVARC	SYGAN S TLGP	VKLSAEGPTT	MTLVCGKDG V	KVPQDNNQYC	SGTTLTGCNE
241 KSFKDILPKL	SENPWQGNAS	SDNGA TLTI N	KEAFPAESKS	VIIGCTGGSP	EKHHCTV Q LE
301 FAGAAGSAKS	S AGTASHVSI	FAMV T GLIGS	IAACVA		

B

Figure 6 : Séquence et épitopes antigéniques du gène SAG1.

A. Séquence de la souche RH publiée par **Burg et coll. (1988)**.

B. Séquence des souches de type II et III. Il existe des sites de polymorphismes (**en gras, rouge ou noir**). De 1 à 6 sont numérotés les décapeptides les plus antigéniques prédits par Alix, (1999).

Peptides spécifiques d'allèles , peptide **Godard et coll. (1994)**

Tableau 6 : Position et séquence de peptides dérivés de SAG1 utilisés dans la littérature

<i>Dénomination</i>	<u><i>Séquence</i></u>	<i>Position</i>	<i>Ref</i>
séquence partielle de SAG1 pour la souche RH	CNEKSFKDILPKL T ENPWQGNASSD K GATLT I KKEAFPA	238-276	Burg et coll, 1988
238-256/I	CNEKSFKDILPKL T ENPWQ	238-256	Godard et coll., 1994
238-253/I	CNEKSFKDILPKL T EN	238-253	Biesmans et coll., 1998
261-275/I	SD K GATLT I KKEAFP	261-275	Kong et coll., 2003
251-265/I	T ENPWQGNASSD K GA	251-265	Marlé et coll, 2005 soumis
251-265/II-III	S ENPWQGNASSD N GA	251-265	

II. Immunoréactivité des peptides

Les premiers essais de coating des différents peptides libres ne nous ont pas permis d'optimiser les paramètres de la réaction en ELISA. Afin d'améliorer la technique, nous avons choisi de coupler ces peptides à une molécule porteuse, l'albumine bovine (BSA).

Le tableau 7 montre la réactivité des peptides en ELISA : pour le peptide 251-255/I, la spécificité (100%) comme la sensibilité vis-à-vis des toxoplasmoses acquises (88.6%) ou congénitales (94%) sont bonnes.

Pour le peptide 251-255/II-III, la spécificité (97.5%) comme la sensibilité vis-à-vis des toxoplasmoses congénitales (92.5%) sont bonnes, alors que la sensibilité vis-à-vis des toxoplasmoses acquises (72.7%) est plus faible. La différence est significative ($p = 0.005$) entre les deux groupes de sérums positifs. Pour le peptide 238-256/I, si la spécificité demeure correcte, la sensibilité pour les deux groupes de sérums est significativement moindre que pour les peptides spécifiques d'allèles ($p < 0.0001$).

Tableau 7 : Réactivité des peptides en ELISA avec un panel de sérums humains positifs et négatifs.

Groupe de sérums	Nombre de sérums testés	% (nombre) d'échantillons qui réagissent avec les peptides synthétisés		
		251-265/I	251-265/II-III	238-256/I
Toxoplasmoses acquises aiguës ou chroniques	44	88.6% (39)	72.7% (32)	52.3% (23)
Toxoplasmoses congénitales	67	94% (63)	92.5% (62)	56.7% (38)
Absence de Toxoplasmose	40	0% (0)	2.5% (1)	2.5% (1)

Parmi les 67 sérums d'enfants atteints de toxoplasmose congénitale, nous en avons testé 25 provenant de 13 enfants pour lesquels le type de la souche était connu (Tableau 8). L'ensemble des sérums est positif pour le peptide 251-265/II-III, et il existe une différence significative entre les peptides spécifiques d'allèles et le peptide 238-256/I. Un ratio (index du peptide 251-265/I / index du peptide. 251-265/II-III) a été calculé afin d'établir une corrélation avec le typage. Si un ratio inférieur à 0.8 est corrélé à la contamination par une souche de type II, un ratio supérieur ne permet pas le sérotypage.

Tableau 8 : Immunoréactivité des peptides envers des sérums typés.

Échantillon de sérum	Typage par PCR-RFLP (SAG1/SAG2)	ELISA result			Ratio 251-265/I / 251-265/II-III
		251-265/I	251-265/II-III	238-256/I	
N°1	I	1.4	1.28	1.65	1.09
N°2	II	0.5	1.34	0.6	0.37
		0.97	1.69	1.5	0.57
N°3	II	1.78	2.54	1.15	0.70
		1.77	3.29	1.33	0.53
N°4	II	1.94	1.83	0.84	1.06
		1.89	2.36	0.65	0.8
		1.32	1.51	0.76	0.87
N°5	II	3.13	2.32	0.83	0.93
		3.4	3.63	1.65	1.34
		1.32	1.18	0.99	1.11
N°6	II	1.10	1.31	0.75	0.83
		1.79	1.81	1.77	0.98
N°7	II	0.66	1.41	0.8	0.46
N°8	II	1.12	1.84	0.61	0.60
		1.81	2.24	0.9	0.80
N°9	II	1.19	1.47	1.2	0.80
		0.74	1.31	1.01	0.56
N°10	II	1.53	2.16	1.45	0.70
		0.85	1	1.3	0.85
N°11	II	0.56	1.55	0.56	0.36
N°12	II	0.86	1.07	0.78	0.80
		1.11	1.06	0.76	1.04
N°13	II	0.97	1.45	1.78	0.66
		2.48	4.8	2.43	0.51

NB : les résultats (index) grisés sont considérés comme négatifs pour le peptide analysé.

En résumé, nous avons montré que les deux peptides spécifiques d'allèles sont antigéniques. Par contre, ils ne nous ont pas permis de réaliser un sérotypage, peut être à cause du trop faible nombre de sérums typés disponibles.

III. Protection et réponse immune après immunisation

III.1 Immunisation et infestation par une souche virulente

Quand les souris sont infestées par voie intrapéritonéale, avec la souche virulente RH et quelles que soient les doses de peptides utilisées, toutes les souris décèdent à une semaine post-infestation. Il n'a pas été possible d'établir de significativité entre les groupes. Nous n'avons pu mettre en évidence d'effet protecteur de la part des peptides lors d'une infection par une souche virulente

III.2 Immunisation et infestation par une souche avirulente

1 Quantification des anticorps spécifiques peptides (ELISA indirecte)

Nous avons choisi de rechercher les IgG spécifiques de peptides. En outre, afin d'analyser la dichotomie Th-1/Th-2, nous avons testé la présence d'IgG1 et d'IgG2a dans les sérums.

Avant infestation : (Figures 7A, 8A et 9A)

Immunisation par le peptide 251-265/I : Seuls quelques sérums possèdent des IgG spécifiques dirigées contre ce peptide. Dans ce groupe, tous les sérums sont négatifs en IgG1 et IgG2a.

Immunisation par le peptide 251-265/II-III : Seul un sérum possède des IgG spécifiques dirigées contre ce peptide. Comme pour l'autre peptide spécifique d'allèles, tous les sérums sont négatifs en IgG1 et IgG2a.

Immunisation par le peptide 238-256/I : La majorité des sérums sont positifs en IgG et IgG1 alors que 2 sérums seulement sont positifs en IgG2a.

Après infestation : (Figures 7B, 8B et 9B)

Immunisation par le peptide 251-265/I : tous les sérums possèdent des IgG et des IgG2a spécifiques en l'absence d'IgG1.

Immunisation par le peptide 251-265/II-III : tous les sérums possèdent des IgG et des IgG2a spécifiques avec un seul sérum présentant des IgG1.

Immunisation par le peptide 238-256/I : Présence d'IgG, d'IgG1 et d'IgG2a.

Avant infestation, seules les souris immunisées avec le peptide 238-256/I ont développé un niveau significatif d'IgG et notamment d'IgG1, ce qui correspond à un profil de réponse immune de type Th-2. Il semblerait que ce peptide se distingue des peptides spécifiques d'allèles (absence d'anticorps décelables par Elisa) en initiant une réponse anticorps anti-peptide.

Après infestation, nous observons une augmentation significative du taux d'IgG due à celle des IgG2a pour les deux peptides spécifiques d'allèles. La réponse immune initiée par ces peptides semble de type Th-1 «like», réponse retrouvée lors d'infections à *T. gondii*, sans différence entre les 2 peptides.

Par contre, pour le peptide 238-256/I, la présence de taux élevés d'IgG1 et IgG2a ne montre pas d'orientation franche de la réponse immune.

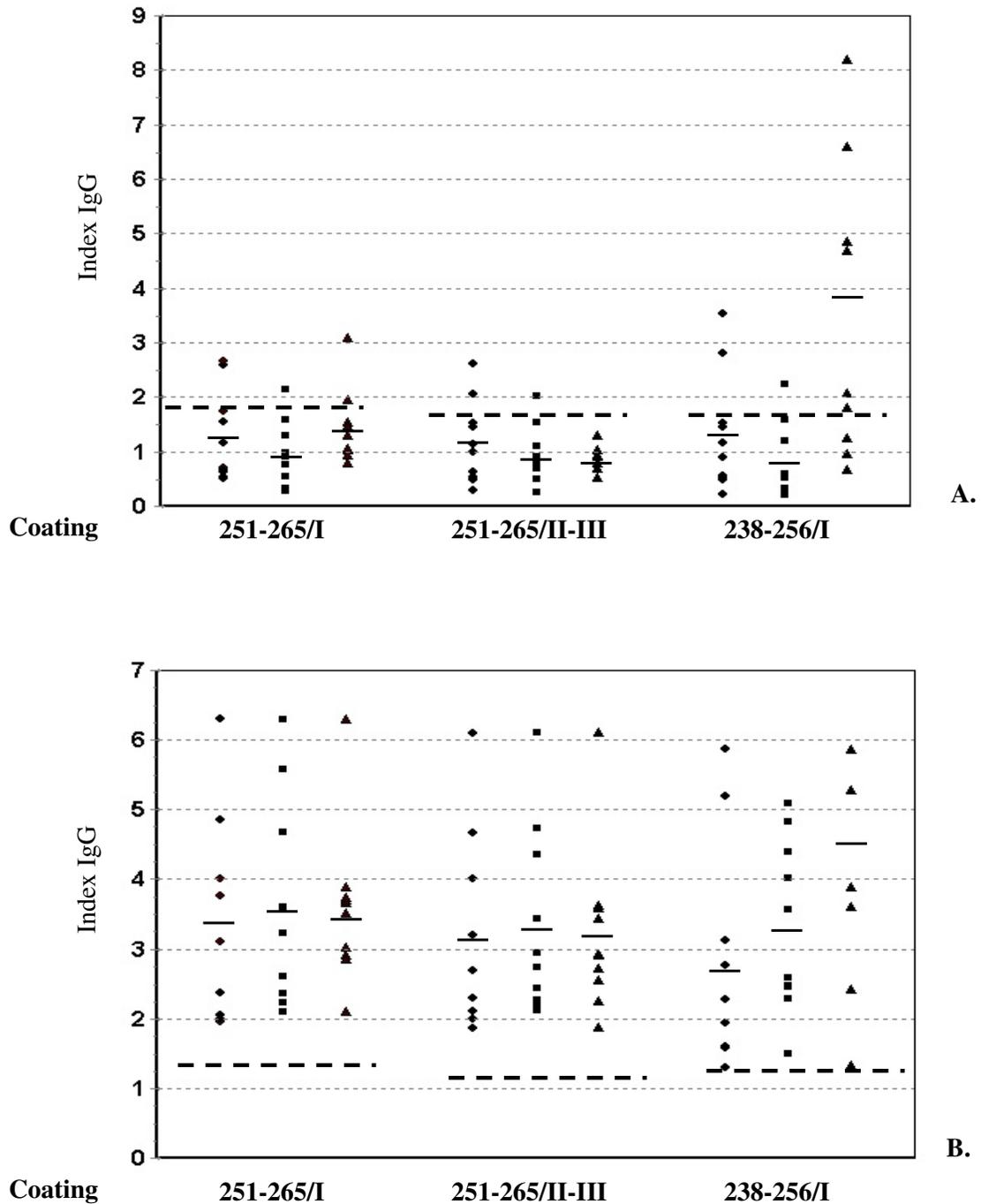


Figure 7: Dosage des IgG dans les sérums de souris immunisées par Elisa utilisant différents coatings. Les souris Swiss sont immunisées avec les peptides 251-265/I, 251-265/II-III et 238-256/I et infestées avec 10^4 tachyzoïtes de la souche PRU. Sérums collectés avant (A) et après (B) infestation. Souris immunisées avec ● 251-265/I, ▲ 251-265/II-III, ■ 238-256/I.

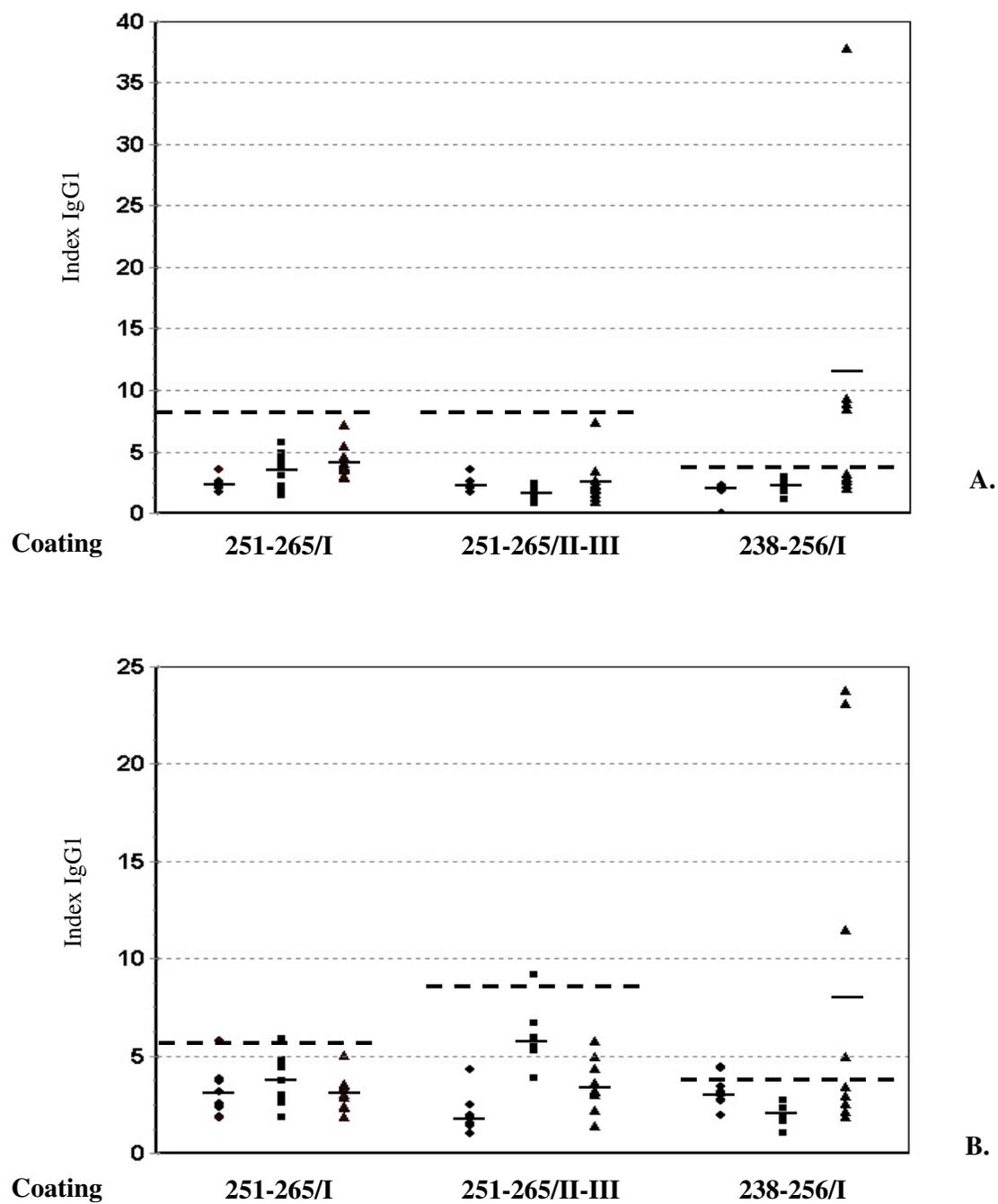


Figure 8 : Dosage des IgG1. Les souris Swiss sont immunisées avec les peptides 251-265/I, 251-265/II-III et 238-256/I en présence d'adjuvant de Freund et infestées avec 10^4 tachyzoïtes de la souche PRU. Les sérums sont collectés avant (A) et après (B) infestation. Souris immunisées avec ●251-265/I, ■ 251-265/II-III, ▲ 238-256/I.

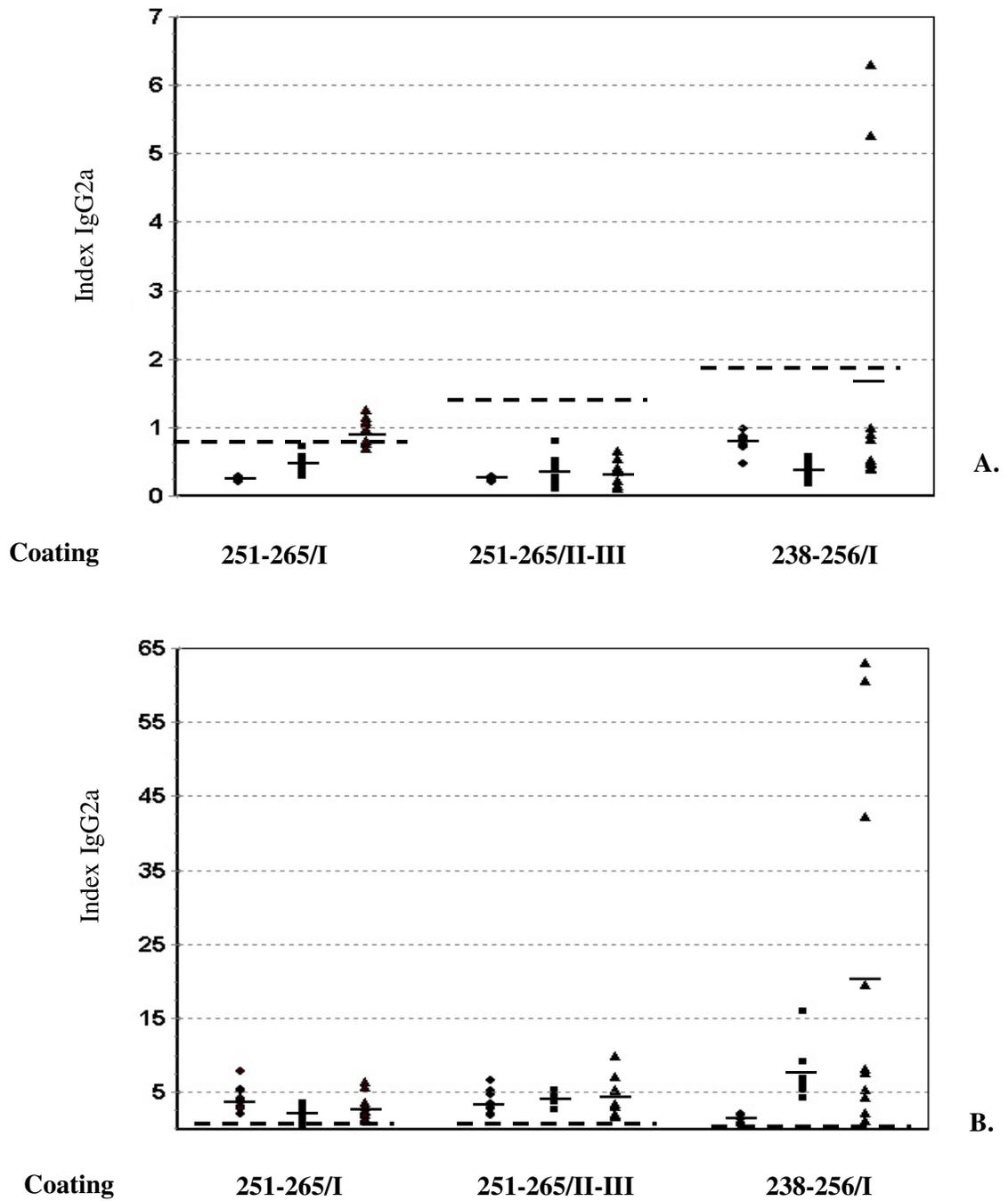


Figure 9: Dosage des IgG2a. Les souris Swiss sont immunisées avec les peptides 251-265/I, 251-265/II-III et 238-256/I en présence d'adjuvant de Freund et infestées avec 10^4 tachyzoïtes de la souche PRU. Les sérums sont collectés avant (A) et après (B) infestation. Souris immunisées avec ● 251-265/I, ■ 251-265/II-III, ▲ 238-256/I

2. Détection des Anticorps par Western blot

Afin de démontrer que la réponse est dirigée contre un constituant de la protéine SAG1, une analyse par Western Blot a été effectuée. Avant infestation, les sérums de souris immunisées avec le peptide 238-256/I ont réagi avec une protéine, identique en taille à celle reconnue par l'anticorps monoclonal GII9 spécifique de SAG1 [Figure 10A (lignes 1 et 10) et Figure 10B]. Les sérums des souris contrôles et immunisées avec les peptides 251-265/I, 251-265/II-III ou l'adjuvant seul, ne présentent pas d'IgG par cette technique (Figure 10A, lignes 2, 4, 6 et 8). Après infestation, un exemple est présenté pour un sérum immunisé avec le peptide 238-256/I Figure 10B montrant un marquage IgG1 et IgG2a.

3. Détection des Anticorps par Immunofluorescence

La sélection des peptides étant basée sur l'existence de polymorphismes entre les souches de type I et non I, nous avons testé la capacité des sérums de souris immunisées à reconnaître les tachyzoïtes des souches RH (type I) et PRU (type II) en immunofluorescence.

Avant infestation, la fluorescence est observée en microscopie confocale seulement lorsque les tachyzoïtes de la souche RH sont incubés avec les sérums de souris immunisées avec le peptide 238-256/I. Nous n'avons détecté aucune fluorescence pour les autres sérums (Figure 11A). Les sérums des souris immunisées avec le peptide 238-256/I sont seulement capables de reconnaître les protéines exprimées à la surface des tachyzoïtes de la souche RH, le marquage étant absent sur les tachyzoïtes de la souche PRU (données non montrées).

Après infestation par la souche PRU, tous les sérums reconnaissent les tachyzoïtes de la souche virulente (RH) et de la souche chronique (PRU) avec une intensité de fluorescence importante (11B).

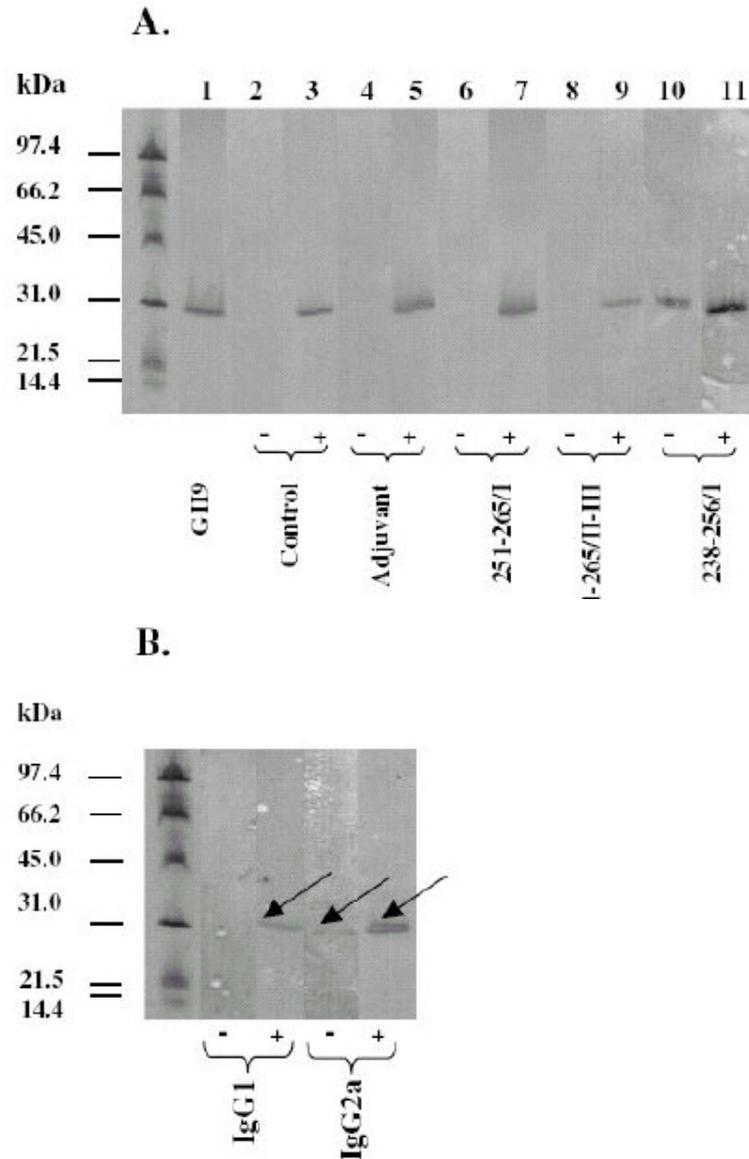


Figure 10 : Western blot avec les antigènes solubles de la souche RH. **A.** antigènes solubles révélés par un anti-souris IgG. **GII9**, anticorps monoclonal; **Contrôle**, sérums de souris non immunisées; **Adjuvant**, sérums de souris immunisées avec l’adjuvant; **251-265/I**, sérums de souris immunisées avec le peptide 251-265/I; **251-265/II-III**, sérums de souris immunisées avec le peptide 251-265/II-III; **238-256/I**; sérums de souris immunisées avec le peptide 238-256/I. **B.** antigènes solubles et sérums de souris immunisées avec 238-256/I révélés par un anti-souris IgG1 ou IgG2a. -, Avant infestation; +, Après infestation.

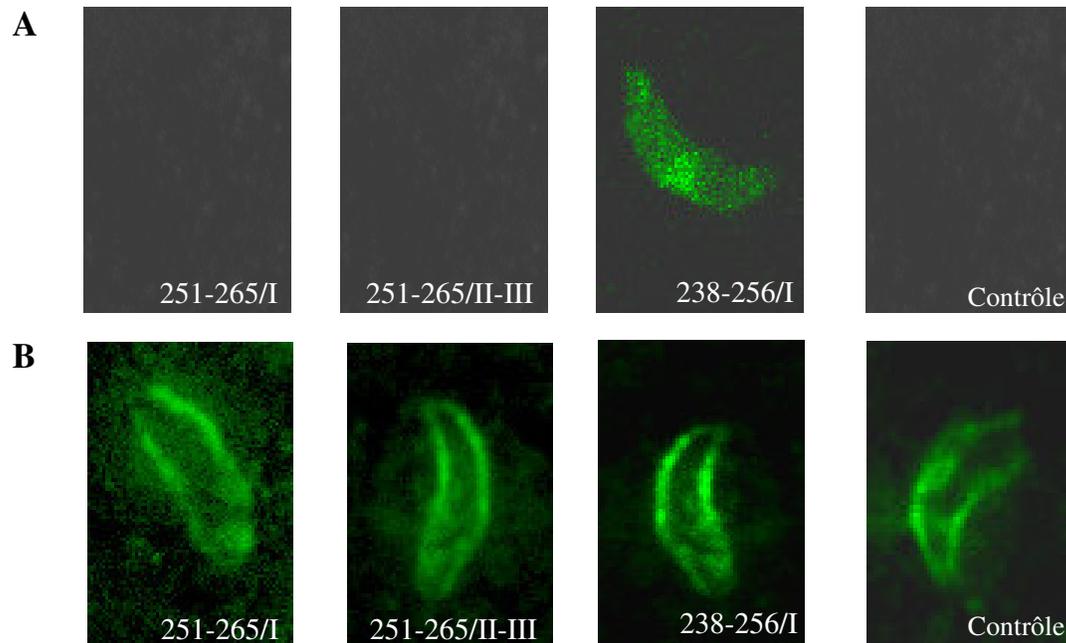


Figure 11 : Immunofluorescence sur tachyzoïtes de la souche RH.

A. Avant infestation. **B.** Après infestation par souche PRU. Sérums de souris immunisées avec le peptide 251-265/I, 251-265/II-III ou 238-256/I. Contrôle, Sérums de souris non immunisées. Microscopie Confocale.

4. Quantification de la charge parasitaire

4.1 Analyse microscopique

Nous avons évalué l'effet protecteur des peptides après infestation par une souche de *T. gondii* non létale. Après trois immunisations, les souris ont été infestées avec 10^4 tachyzoïtes de la souche PRU. La protection est mesurée par la réduction de la charge parasitaire intracérébrale, un mois après infestation. Une réduction significative du nombre de kystes ($p <$

0,05) est observée dans le groupe de souris immunisées avec le peptide 251-265/II-III (Figure 12).

Le nombre de kystes chez les souris immunisées avec le peptide 251-265/I tend à décroître, alors qu'il augmente chez les souris immunisées avec le peptide 238-256/I et l'adjuvant. Ces résultats indiquent que, dans ce modèle, seuls les peptides spécifiques d'allèles peuvent induire une protection partielle lors d'une infection chronique à *T. gondii*. Les mêmes résultats ont été obtenus lors de deux expérimentations similaires.

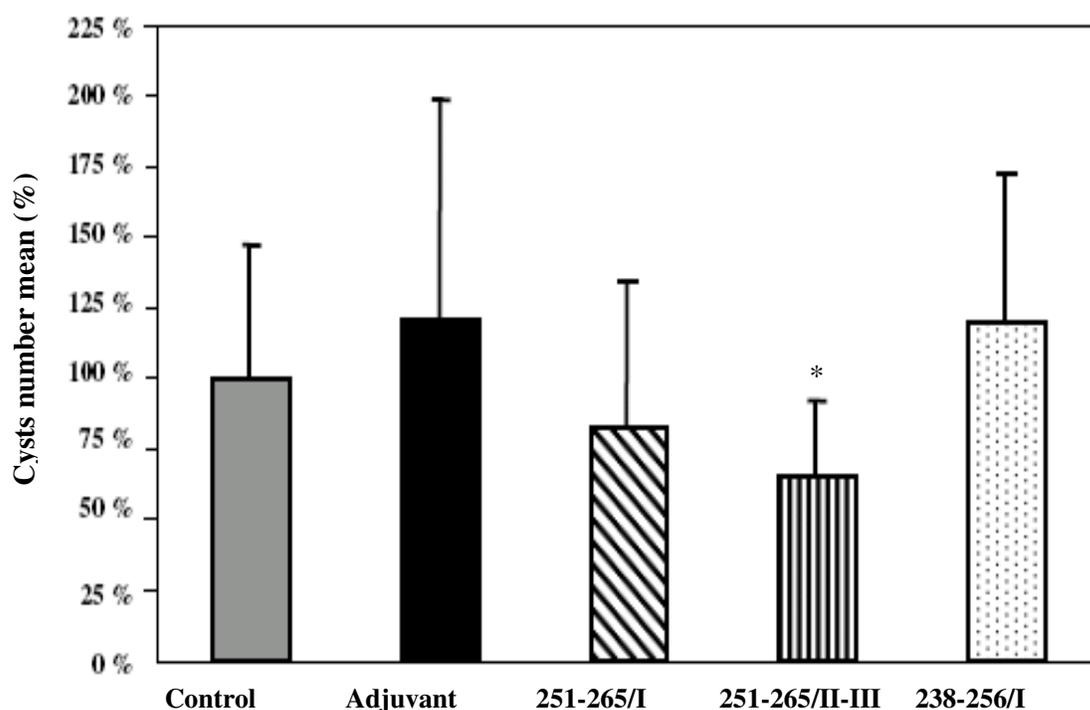


Figure 12: Les effets de l'immunisation sur le nombre de kystes chez la souris infectée par *T. gondii*. Les souris sont infestées par voie intrapéritonéale avec 10^4 tachyzoïtes de la souche PRU. Une numération des kystes est effectuée pour chaque groupe à partir de l'homogénéisat du cerveau entier. Les résultats sont exprimés en moyenne du nombre de kystes par cerveau (n=10) ± déviation standard. (* $p < 0.05$).

4.2 Analyse par PCR quantitative

Nous avons aussi analysé la charge parasitaire en PCR quantitative en temps réel. Les résultats sont détaillés dans le tableau 9. Le nombre de parasites intracérébraux, estimé par amplification du gène B1 en PCR quantitative, n'est pas significativement différent entre les groupes même si un résultat plus élevé a été retrouvé par cette technique dans les cerveaux de souris immunisées avec le peptide 238-256/I.

Tableau 9 : Nombre de parasites chez la souris Swiss à J30 postinfection.

Souris n=10	Parasitémie (moyenne \pm écart type)
Contrôles	70,8 \pm 40,6
Souris immunisées avec l'adjuvant de Freund	99,2 \pm 51,22
Souris immunisées avec le peptide 251-265/I	70,3 \pm 43,76
Souris immunisées avec le peptide 251-265/II-III	64,58 \pm 26,31
Souris immunisées avec le peptide 238-256/I	125,6 \pm 83,93

En résumé, nous avons montré que l'immunisation par les deux peptides spécifiques d'allèles entraînait une protection partielle (diminution du nombre de kystes intracérébraux) lors de l'infestation par une souche avirulente. Les sérums des souris immunisées par ces peptides puis infestées montrent un profil de réponse immune humorale de type Th-1 avec synthèse importante d'IgG2a en l'absence d'IgG1 sans différence entre les 2 peptides. Par contre, les souris immunisées par le peptide 238-256/I présentent un profil polyisotypique (IgG1 et IgG2a) et montre une augmentation du nombre de kystes intracérébraux objectivée par microscopie et PCR quantitative. Aucune protection n'a été observée, quelle que soit la dose de peptides utilisée, lors de infestation par la souche RH.

IV. Etude de l'effet des peptides 251-265/I et 251-265/II-III dérivés de SAG1 sur les propriétés immunomodulatrices des cellules dendritiques humaines immatures

IV.1 Effets des peptides 251-265/I et 251-265/II-III sur la maturation des cellules dendritiques humaines

Les cellules dendritiques immatures ont été obtenues à partir de monocytes humains cultivés pendant cinq jours en présence de GM-CSF recombinant (500 U/mL) et d'IL-4 recombinante (500 U/mL) puis traités par différentes concentrations (0.01 à 1 µg/mL) des peptides 251-265/I et 251-265/II-III. Le LPS d'*E. Coli* O111:B4, décrit comme un puissant stimulus de maturation des cellules dendritiques, a été utilisé à la concentration de 1 µg/mL comme contrôle positif de maturation. Un extrait soluble de *T. gondii* à la concentration de 50 µg/mL a été utilisé dans nos expériences sur la base de son implication dans la maturation des cellules dendritiques humaines. Enfin, un peptide irrelevant, à la concentration de 1 µg/mL et correspondant à une séquence aléatoire du peptide d'intérêt 251-265/II-III, a été utilisé comme contrôle négatif.

Après 2 jours d'incubation en présence des peptides 251-265/I et 251-265/II-III ou en présence du LPS ou du peptide irrelevant ou d'un extrait soluble de *T. gondii*, le niveau d'expression des marqueurs d'activation et de maturation des cellules dendritiques CD14, CD80, CD83, CD86 et CD1a a été analysé par cytométrie en flux. Les figures 13 et 14 présentent les résultats d'une expérience représentative étudiant le niveau d'expression des différents marqueurs d'activation et de maturation à la surface des monocytes, des cellules dendritiques immatures non traitées et traitées par le LPS ou le peptide irrelevant. La figure 15 présente les résultats d'une expérience représentative obtenue après traitement des cellules dendritiques immatures par l'extrait soluble de *T. gondii* ou par les peptides 251-265/I et

251-265/II-III utilisés à la concentration de 1 µg/mL. Le Tableau 10 résume les résultats obtenus à partir de différents donneurs et à partir de différentes concentrations de peptides.

Les cellules dendritiques humaines obtenues après traitement des monocytes (CD14⁺⁺⁺ CD80⁻ CD83⁻ CD86^{faible} CD1a⁻, Figure 13 A et Tableau 10 pour la définition des niveaux d'expression des marqueurs) avec le GM-CSF et l'IL-4 expriment un phénotype caractéristique des cellules dendritiques immatures : CD14⁻ CD80^{faible} CD83^{faible} CD86⁺ CD1a⁺⁺⁺ (Figure 13 B et Tableau 10). Le traitement par le LPS a pour conséquence une maturation phénotypique des cellules dendritiques immatures (Figure 14 A et Tableau 10) qui sur-expriment les marqueurs de surface CD80, CD83 et CD86 alors que les marqueurs CD14 et CD1a restent stables (CD14⁻ CD80⁺⁺ CD83⁺⁺⁺ CD86⁺⁺ CD1a⁺⁺⁺). En présence du peptide irrelevant, le niveau d'expression des marqueurs CD14, CD80, CD83, CD86 et CD1a est comparable au niveau d'expression des mêmes marqueurs à la surface des cellules dendritiques immatures (Figure 14 B et Tableau 10). Un niveau de conversion comparable à celui induit par le LPS est retrouvé pour les marqueurs CD14, CD80, CD86 et CD1a (Figure 15 A et Tableau 10) lors du traitement des cellules dendritiques immatures avec l'extrait soluble de *T. gondii* (CD14⁻ CD80⁺⁺ CD86⁺⁺ CD1a⁺⁺⁺). Cependant, et contrairement au LPS, deux populations cellulaires distinctes exprimant le CD83, apparaissent après 2 jours de traitement avec l'extrait soluble de *T. gondii* (Figure 15 A). L'analyse phénotypique et statistique révèle la présence respective de 47 ± 4,6% et 53 ± 4,6% de cellules CD83⁺⁺⁺ et CD83^{faible} (Tableau 10). Après 2 jours de culture en présence d'une concentration en peptide 251-265/I ou en peptide 251-265/II-III de 1 µg/mL, les cellules dendritiques immatures sur-expriment les marqueurs CD80, CD83 et CD1a alors que l'expression du marqueur CD86 n'est significativement pas modifiée (Figures 15 B, 15 C et Tableau 10). Le traitement par l'un ou l'autre des peptides de SAG1 conduit également à l'apparition de deux fractions cellulaires exprimant le CD83. L'analyse statistique montre que 59,6 ± 3,4% des cellules dendritiques immatures traitées par le peptide 251-265/I et 57,3 ± 4% des cellules dendritiques immatures traitées par le peptide 251-265/II-III expriment le CD83 à

un niveau élevé (CD83⁺⁺⁺). Pour des concentrations de peptides de 0,1 et 1 µg/mL, aucune différence significative du niveau d'expression des marqueurs CD80, CD83, CD86 et CD1a n'est observée entre les cellules dendritiques traitées par le peptide 251-265/I et celles traitées par le peptide 251-265/II-III. En revanche, les peptides utilisés à la concentration de 0,01 µg/mL n'influencent pas le niveau d'expression des différents marqueurs à la surface des cellules dendritiques immatures. Par ailleurs, le niveau d'expression du marqueur CD80 à la surface des cellules dendritiques immatures traitées par les peptides est toujours inférieur à celui induit par le traitement des cellules par le LPS ou par l'extrait soluble de *T. gondii* ($p < 0,05$). Le niveau d'expression du marqueur CD83 est quant à lui toujours très supérieur après traitement par les peptides en comparaison du niveau observé lors du traitement par le LPS ou par l'extrait soluble de *T. gondii* ($p < 0,05$).

En résumé, l'ensemble des résultats obtenus montre que les cellules dendritiques humaines immatures mises en présence des peptides 251-265/I et 251-265/II-III dérivés de la protéine SAG1 sur-exprime : 1/ la molécule de co-stimulation CD80 sans modification du niveau d'expression de la molécule de co-stimulation CD86 et 2/ la molécule CD83 mais de façon partielle, 40% des cellules dendritiques n'expriment que très faiblement le marqueur CD83 après traitement peptidique. Ces résultats suggèrent une implication, cependant incomplète, des peptides 251-265/I et 251-265/II-III dans la maturation des cellules dendritiques.

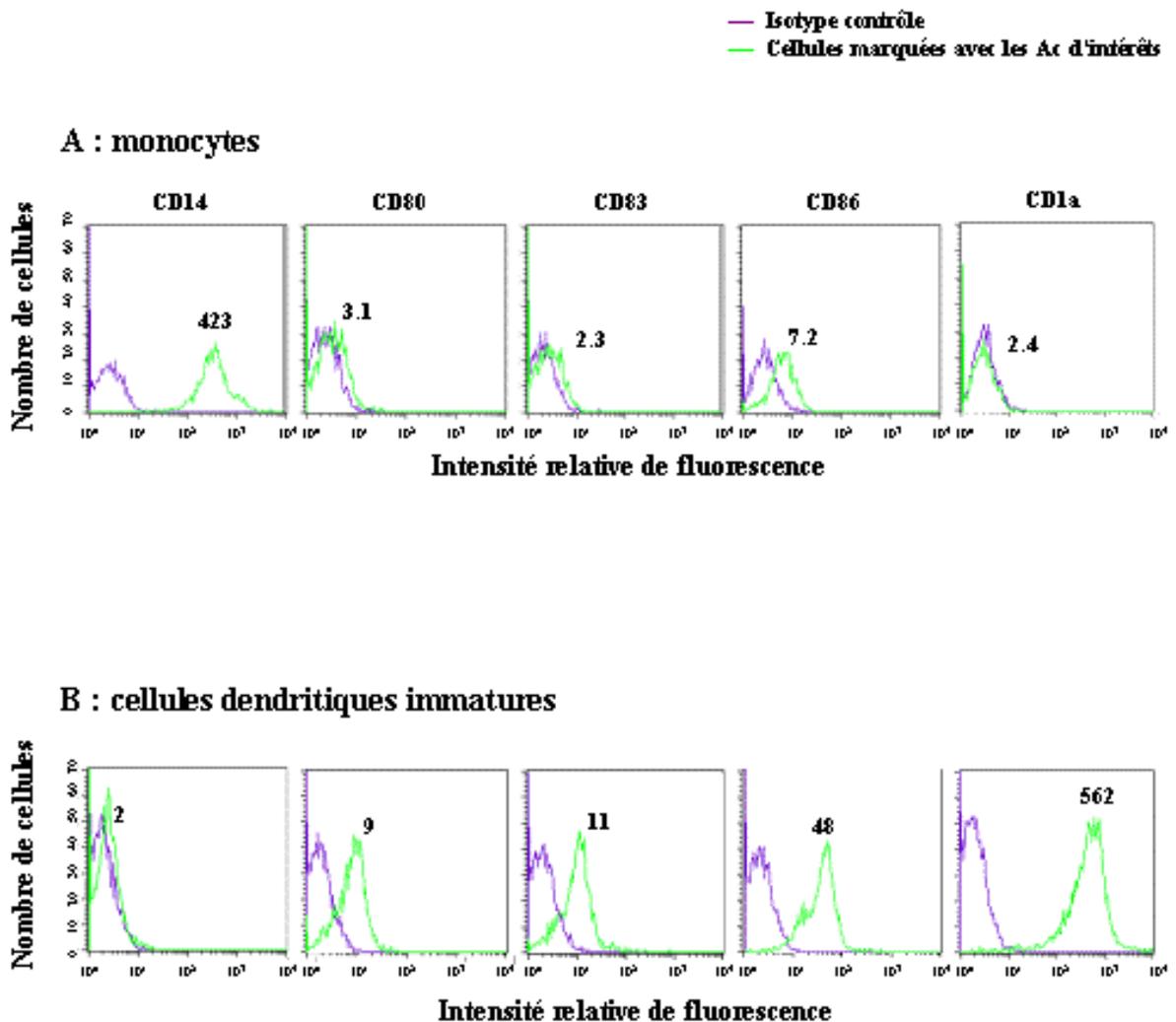


Fig 13 : Expression des molécules CD14, CD80, CD83, CD86 et CD1a à la surface des monocytes et des cellules dendritiques immatures*

(* Les valeurs indiquées dans chacune des représentations bi-paramétriques correspondent à l'intensité relative de fluorescence au pic de la représentation gaussienne ce qui permet d'apprécier rapidement l'évolution des niveaux d'expression des différents marqueurs)

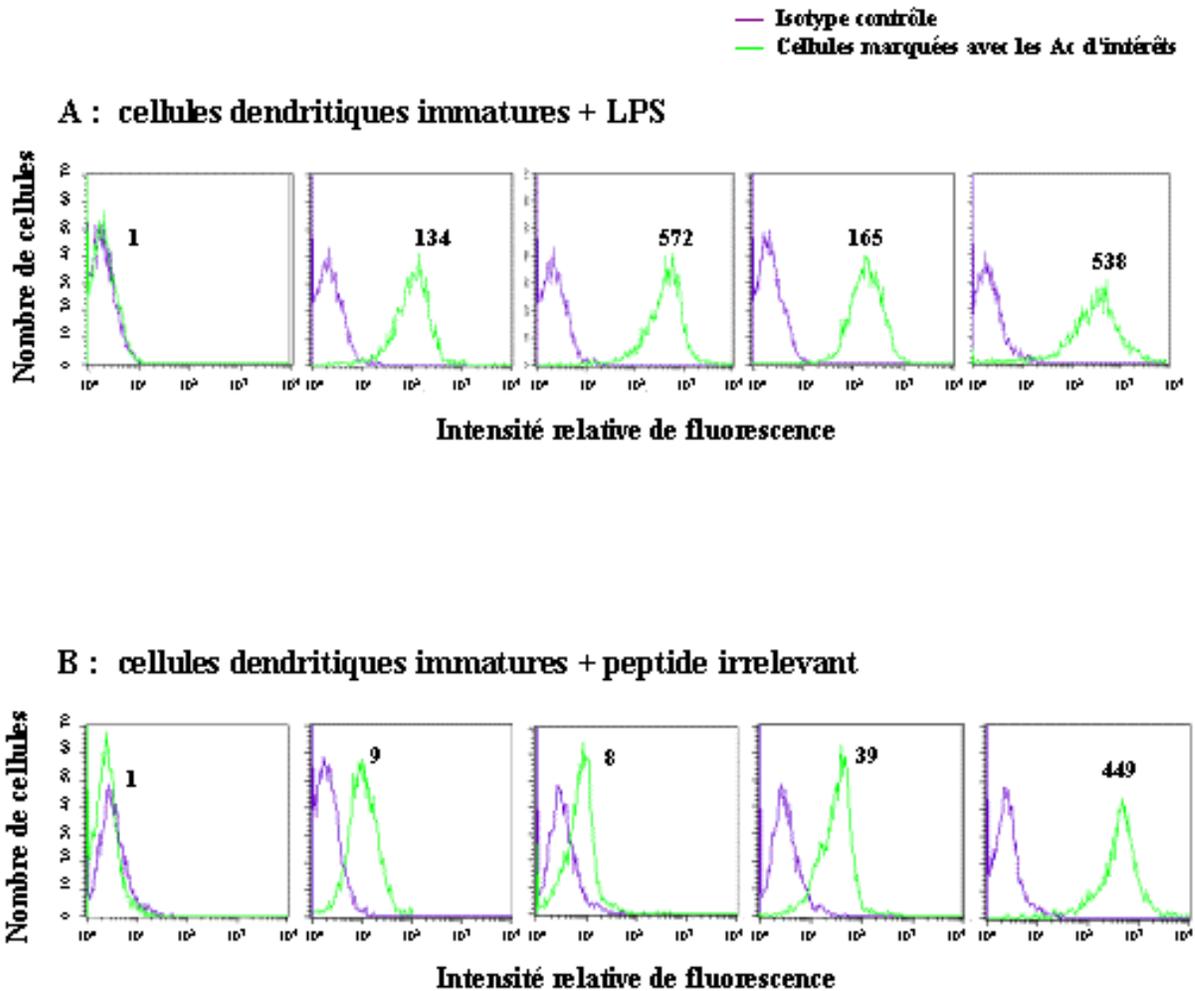
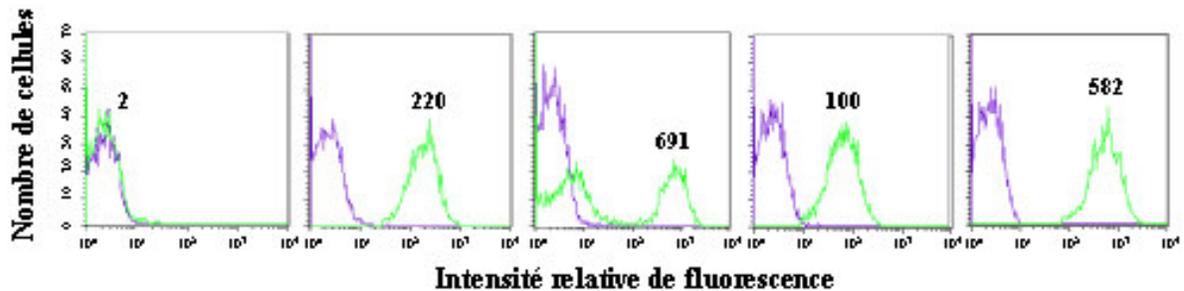


Fig 14 : Expression des molécules CD14, CD80, CD83, CD86 et CD1a à la surface des cellules dendritiques immatures traitées par le LPS ou le peptide irrelevant*

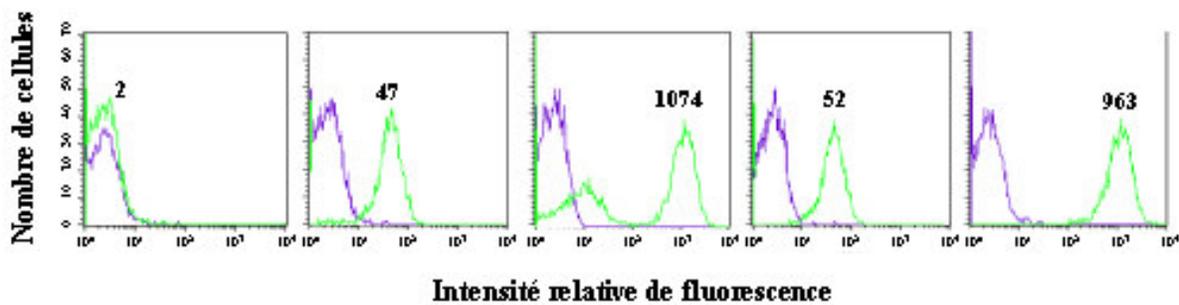
(* les valeurs indiquées dans chacune des représentations biparamétriques correspondent à l'intensité relative de fluorescence au pic de la représentation gaussienne ce qui permet d'apprécier rapidement l'évolution des niveaux d'expression des différents marqueurs)

— Isotype contrôle
 — Cellules marquées avec les Ac d'intérêt

A : cellules dendritiques immatures + extrait soluble de *Toxoplasma gondii*



B : cellules dendritiques immatures + peptide 251-265/I



C : cellules dendritiques immatures + peptide 251-265/II-III

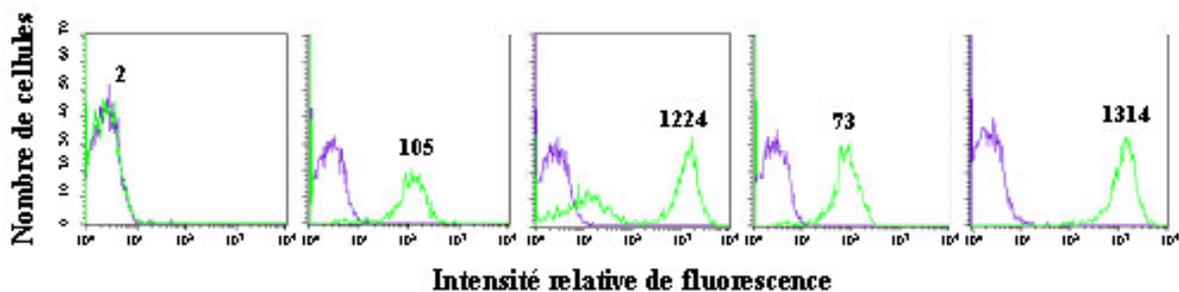


Fig 15 : Expression des molécules CD14, CD80, CD83, CD86 et CD1a à la surface des cellules dendritiques humaines immatures traitées par un extrait soluble de *Toxoplasma gondii* et par les peptides 251-165/I et 251-265/II-III dérivés de SAG-1*

(* les valeurs indiquées dans chacune des représentations bi-paramétriques correspondent à l'intensité relative de fluorescence au pic de la représentation gaussienne ce qui permet d'apprécier rapidement l'évolution des niveaux d'expression des différents marqueurs)

Tableau 10. Analyse phénotypique des cellules dendritiques humaines immatures traitées par différentes concentrations des peptides 251-165/I et 251-265/II-III

	CD14	CD80	CD83^{low}	CD83⁺⁺⁺	CD86	CD1a
CD immatures non traitées	1,7 ± 0.5	11,4 ± 2.5	14,3 ± 2.9	-	64 ± 16.2	704 ± 138
LPS (1 µg/mL)	1,2 ± 0.3	178 ± 51	-	603 ± 33	199 ± 33	645 ± 131
Peptide irrelevant (1 µg/mL)	1,1 ± 0.1	8,9 ± 2,1	10,1 ± 2,1	-	54 ± 18	538 ± 71
Extrait soluble de <i>T. gondii</i> (50 µg/mL)	1,9 ± 0.3	194 ± 23	10,3 ± 1.2 (53 ± 4.6%)	637 ± 52 (47 ± 4.6%)	115 ± 13.5	664 ± 123
251-265/I (pg/mL)						
0.01	1,4 ± 0.6	13,9 ± 3.1	12,7 ± 1.8	-	68,7 ± 20.3	643 ± 163
0.1	2,1 ± 1.1	66,2 ± 29.5	11,8 ± 1.8 (43.1 ± 2.9%)	934 ± 125 (56.9 ± 2.9%)	59,2 ± 23.1	904 ± 175
1	1,5 ± 0.3	65,6 ± 20.1	12,7 ± 2.2 (40.3 ± 3.5%)	887 ± 195 (59.7 ± 3.5%)	65,7 ± 20.3	868 ± 145
251-265/II-III (pg/mL)						
0.01	2,1 ± 0.5	12,8 ± 2.3	11,7 ± 1.6	-	59,7 ± 17.3	673 ± 102
0.1	1,8 ± 0.4	68,2 ± 20.5	13,3 ± 2.5 (56 ± 13%)	982 ± 367 (55.3 ± 6.7%)	65,7 ± 20.3	714 ± 210
1	1,8 ± 0.6	82,3 ± 15.5	12,9 ± 1.8 (42.7 ± 4%)	1071 ± 406 (57.3 ± 4%)	68,5 ± 8.9	1102 ± 292

Les valeurs indiquées dans le tableau correspondent aux valeurs moyennes, majorées ou minorées de leur déviation standard, des intensités relatives de fluorescence mesurées au pic de la représentation gaussienne pour les différents marqueurs. Ces valeurs ont été déterminées à partir de trois expériences indépendantes réalisées avec les cellules de trois donneurs différents.

Niveau d'expression des marqueurs :

-	Pic de fluorescence entre 1 et 5
faible	Pic de fluorescence entre 5,1 et 30
+	Pic de fluorescence entre 31 et 100
++	Pic de fluorescence entre 101 et 400
+++	Pic de fluorescence supérieur à 400

IV.2 Effets des peptides 251-265/I et 251-265/II-III sur la production de cytokines par les cellules dendritiques humaines

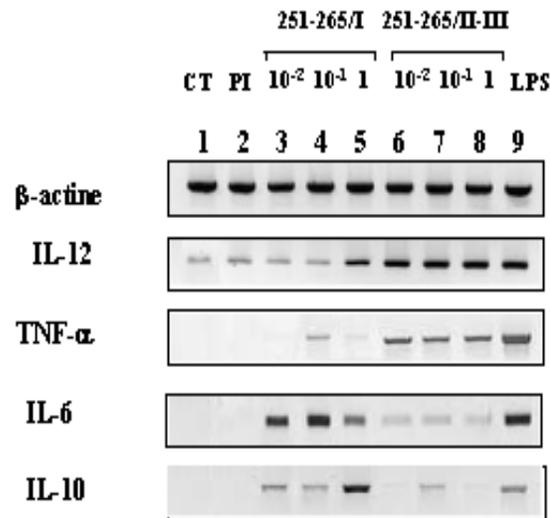
Afin d'étudier les effets des peptides 251-265/I et 251-265/II-III sur l'activation des cellules dendritiques immatures, la production des cytokines proinflammatoires TNF- α et IL-6 ainsi que la production de l'IL-12 et de l'IL-10 ont été déterminées au niveau de l'expression des gènes codant pour les cytokines (étude de l'expression des ARNm par RT-PCR) et au niveau de la production des protéines dans les surnageants de culture (technique ELISA) avant et après traitement par différentes concentrations des peptides. Le LPS *d'E. Coli* O111:B4, puissant inducteur de la production de cytokines par les cellules dendritiques, est utilisé à la concentration de 1 $\mu\text{g/mL}$ et comme contrôle positif. Le peptide irrelevant, utilisé à la concentration de 1 $\mu\text{g/mL}$, a été utilisé comme contrôle négatif. La figure 16 présente les résultats d'une expérience représentative étudiant le niveau d'expression des ARNm pour l'IL-12, le TNF- α , l'IL-6 et l'IL-10 dans les cellules dendritiques humaines immatures non traitées ou traitées par le LPS, par le peptide irrelevant ou par les peptides 251-265/I et 251-265/II-III utilisés à différentes concentrations (0,01 à 1 $\mu\text{g/mL}$). La figure 17 présente une analyse quantitative sur plusieurs donneurs du niveau d'expression des ARNm de l'IL-12, du TNF- α , de l'IL-6 et de l'IL-10 dans les mêmes conditions expérimentales. Les figures 18 et 19 présentent respectivement les niveaux de sécrétion des différentes cytokines dans les surnageants de culture de cellules dendritiques immatures traitées ou non par le LPS ou le peptide irrelevant et traitées par différentes concentrations des peptides 251-265/I et 251-265/II-III.

Les cellules dendritiques humaines immatures expriment de façon constitutive un niveau faible mais détectable d'ARNm codant pour l'IL-12 mais n'expriment pas spontanément les ARNm codant pour le TNF- α , l'IL-6 et l'IL-10 (Figure 16, ligne 1). Le peptide irrelevant montre un niveau d'expression des ARNm des différentes cytokines comparable à celui des

cellules dendritiques immatures non traitées (Figure 16, ligne 2). Le LPS, utilisé à la concentration de 1 µg/mL, induit une sur-expression forte des transcrits IL-12, TNF-α et IL-6 par les cellules dendritiques immatures, et, à un moindre niveau, celui des transcrits IL-10 (Figure 16, ligne 9). Des résultats similaires sont retrouvés au niveau protéique lors du dosage des cytokines dans les surnageants de culture des cellules dendritiques immatures non traitées ou traitées par le LPS ou le peptide irrelevant (Figure 18). En comparaison des niveaux d'expression des ARNm codant pour les cytokines dans les cellules dendritiques immatures non traitées, l'activation des cellules dendritiques avec des doses croissantes du peptide 251-265/I a pour conséquence une augmentation substantielle et progressive des transcrits IL-12, TNF-α, et IL-10 (Figure 16, ligne 3-5 et Figure 17). Concernant l'IL-6, le traitement par le peptide 251-265/I induit une augmentation brutale des transcrits dès la concentration de 0,01 µg/mL qui se maintient constante aux plus fortes concentrations (Figure 16, ligne 3 à 5 et Figure 17). Cependant, contrairement aux résultats obtenus avec le LPS, l'activation par le peptide 251-265/I induit une augmentation plus discrète des niveaux d'expression des ARNm de l'IL-12 et du TNF-α alors que les transcrits pour l'IL-6 et l'IL-10 ont un niveau d'expression significativement plus importants (Figure 16, ligne 3-5 et ligne 9 et Figure 17). La régulation du niveau d'expression des ARNm des cytokines après traitement par le peptide 251-265/I a été confirmée par ELISA (Figure 19). A l'opposé des résultats obtenus avec le peptide 251-265/I, le traitement des cellules dendritiques immatures par le peptide 251-265/II-III a pour conséquence une expression des ARNm codant pour l'IL-12 et le TNF-α à des niveaux comparables à ceux obtenus avec le LPS et ceci dès la concentration de 0,01 µg/mL (Figure 16, ligne 6-8 et ligne 9 et Figure 17). A l'opposé, les niveaux des transcrits IL-6 et IL-10 sont peu augmentés en comparaison avec ceux obtenus après traitement par le LPS (Figure 16, ligne 6-8 et ligne 9 et Figure 17). En adéquation avec l'évolution des niveaux d'expression des ARNm après traitement par le peptide 251-265/II-III, les quantités d'IL-12 et de TNF-α dosées dans les surnageants de culture des cellules dendritiques sont

significativement plus élevées que les quantités dosées pour l'IL-6 (Figure 19, $p < 0,05$). Dans des conditions expérimentales de traitement des cellules dendritiques immatures par le peptide 251-265/II-III, la régulation du niveau d'expression des ARNm codant pour l'IL-10 n'est pas confirmée au niveau de la protéine qui reste indétectable dans les surnageants de culture (Figure 19).

En résumé, l'ensemble des résultats obtenus montre une régulation différentielle des peptides 251-265/I et 251-265/II-III vis-à-vis de la production de TNF- α , d'IL-6 et d'IL-10 par les cellules dendritiques humaines immatures. En effet, si les peptides 251-265/I et 251-265/II-III sont tous deux capables d'induire une augmentation significative de la production des quatre cytokines par les cellules dendritiques immatures, le peptide 251-265/I induit une production majoritairement plus importante d'IL-6 et d'IL-10 en comparaison des effets du peptide 251-265/II-III vis-à-vis de ces trois cytokines alors que le peptide 251-265/II-III induit une production de TNF- α très supérieure à celle du peptide 251-265/I. La différence d'activité des deux peptides vis-à-vis de la production de l'IL-12 est moins prononcée et dépend de la concentration de peptide utilisée.



CT: cellules dendritiques non traitées
 PI: traitement par le peptide irrelevant

Figure 16 : Etude du niveau d'expression des ARNm de l'IL-12, du TNF- α , de l'IL-6 et de l'IL-10 dans les cellules dendritiques immatures non traitées ou traitées par les peptides 251-265/I et 251-265/II-III

*Les résultats présentés sont ceux d'une expérience significative extraite de quatre expériences indépendantes réalisées avec les cellules de quatre donneurs différents

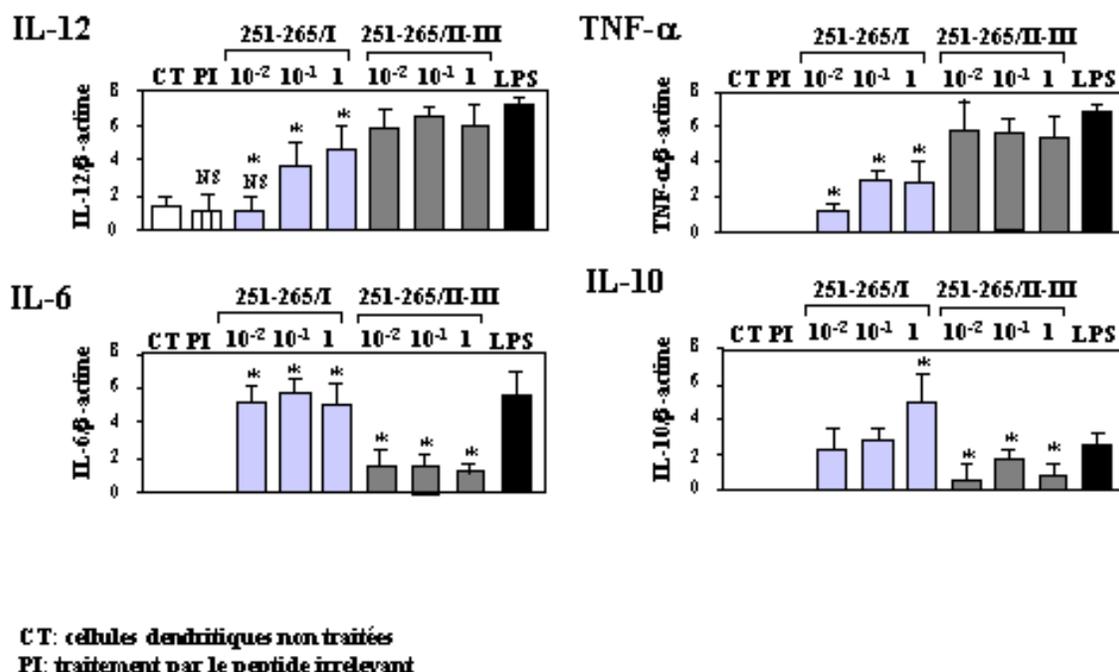
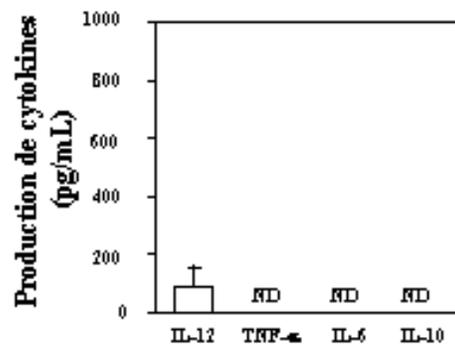


Figure 17 : Analyse quantitative du niveau d'expression des ARNm de l'IL-12, du TNF- α , de l'IL-6 et de l'IL-10 dans les cellules dendritiques immatures non traitées ou traitées par les peptides 251-265/I et 251-265/II-III*

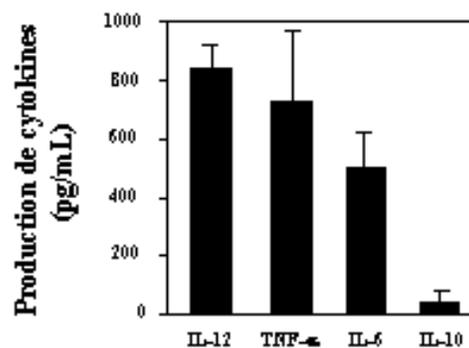
*Les données des différents histogrammes présentant les valeurs moyennes, moyennes cumulées et de leur déviation standard, déterminées à partir de quatre expériences indépendantes réalisées avec les cellules de quatre donneurs différents. Les différences dans le niveau d'expression des ARNm codant pour les cytokines entre les cellules non traitées et les cellules traitées par les différents inducteurs sont statistiquement significatives ($p < 0,05$) sauf lorsque la mention NS est portée dans la figure.

* Les différences dans le niveau d'expression des ARNm codant pour les cytokines entre les cellules traitées par les peptides 251-265/I ou 251-265/II-III et les cellules traitées par Le LPS pris comme valeur de référence sont significatives ($p < 0,05$)

Cellules dendritiques immatures non traitées



LPS (1 μ g/mL)



Peptide irrelevante (1 μ g/mL)

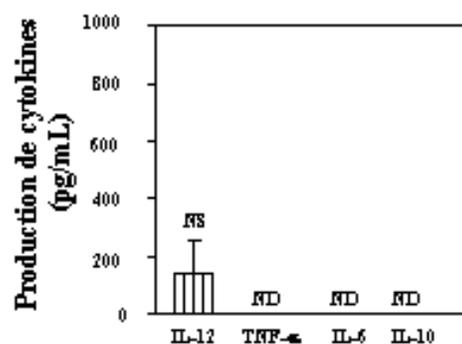


Figure 18 : Etude du niveau de production de l'IL-12, du TNF- α , de l'IL-6 et de l'IL-10 dans les surnageants de culture de cellules dendritiques immatures non traitées ou traitées par un peptide irrelevante ou par le LPS*

* Les données des différents histogrammes présentent les valeurs moyennes, majorées ou minorées de leur déviation standard, déterminées à partir de quatre expériences indépendantes réalisées avec les cellules de quatre donneurs différents. ND : Non détecté

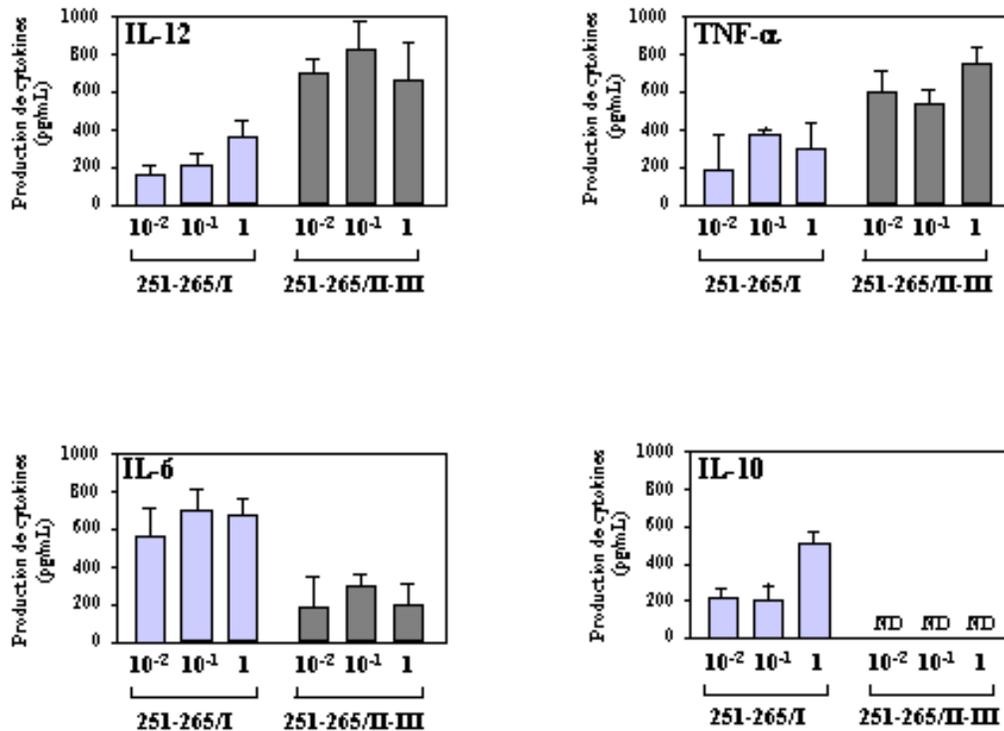


Figure 19 : Etude du niveau de production de l'IL-12, du TNF- α , de l'IL-6 et de l'IL-10 dans les surnageants de culture de cellules dendritiques immatures traitées par les peptides 251-265/I et 251-265/II-III*

*Les données des différents lots grammes posent les valeurs moyennes, majoritairement accompagnées de leur déviation standard, déterminées à partir de quatre expériences indépendantes réalisées avec les cellules de quatre donneurs différents. Les différences dans les niveaux de production de cytokines entre les cellules non traitées et les cellules traitées par les peptides 251-265/I ou 251-265/II-III sont statistiquement significatives ($p < 0,05$). ND : Non détecté

IV.3. Co-culture de lymphocytes humains autologues avec des cellules dendritiques immatures pulsées par les peptides 251-265/I et 251-265/II-III: conséquences sur la prolifération des lymphocytes T et la synthèse d'IFN- γ par les lymphocytes T

La captation et l'apprêtement d'antigènes, principales caractéristiques des cellules dendritiques immatures, et l'activation des cellules dendritiques immatures vers un processus de maturation font de ces cellules de puissants activateurs de la prolifération lymphocytaire T et de la synthèse de cytokines dépendante des cellules T. Par ailleurs, nous avons montré précédemment que les peptides 251-265/I et 251-265/II-III ont des effets potentiels, bien qu'incomplets, sur l'expression des marqueurs de co-stimulation et de maturation des cellules dendritiques immatures. Sur la base de ces résultats, nous avons voulu déterminer si les effets régulateurs des peptides sur l'activation et la maturation des cellules dendritiques immatures tels que nous les avons observés, pouvaient être corrélés avec une éventuelle capacité des cellules dendritiques pulsées avec ces peptides à induire la prolifération des lymphocytes T et à orienter la réponse immune T helper. Dans ce but, un essai de présentation d'antigènes a été réalisé afin de comparer la présentation antigénique des cellules dendritiques immatures pulsées avec 1 $\mu\text{g/mL}$ du peptide 251-265/I ou du peptide 251-265/II-III avec celle obtenue en présence de 10 $\mu\text{g/mL}$ d'antigène de toxine tétanique ou en présence de 1 $\mu\text{g/mL}$ de LPS *E. Coli* O111:B4 (la présentation de ces antigènes ayant été décrite dans la littérature comme efficace pour induire une prolifération lymphocytaire). Le choix du LPS s'est imposé car nous avons montré dans notre système expérimental qu'il induisait une maturation complète des cellules dendritiques immatures. Les résultats que nous avons obtenus, sont présentés dans la figure 20 et indiquent que les cellules dendritiques immatures pulsées avec la toxine tétanique ou le LPS induisent une prolifération significative et comparable des lymphocytes T CD4⁺ autologues, démontrant clairement la capacité des cellules dendritiques à présenter ces deux

antigènes. Les cellules dendritiques immatures pulsées avec le peptide 251-265/I ou le peptide 251-265/II-III induisent également une prolifération cellulaire significative des cellules T CD4⁺ quand on la compare à celle obtenue en utilisant des cellules dendritiques pulsées avec du PBS avec, cependant, des niveaux de prolifération très inférieurs à ceux obtenus avec la toxine tétanique et le LPS. La stimulation des lymphocytes T CD4⁺ est comparable pour les cellules dendritiques immatures pulsées avec le peptide 251-265/I ou le peptide 251-265/II-III.

Afin d'analyser l'influence de l'interaction entre les cellules T et les cellules dendritiques immatures pulsées par les peptides sur les propriétés immunomodulatrices des lymphocytes T humains, nous avons étudié le niveau d'expression intracellulaire dans les lymphocytes T de l'IFN- γ , cytokine de type Th-1, et de l'IL-4, cytokine de type Th-2 par la technique de cytométrie en flux. Dans la co-culture, les lymphocytes T CD4⁺ ont été distingués des cellules dendritiques en réalisant une fenêtre sur les événements T CD3⁺CD4⁺. Comme le montre la figure 21, les lymphocytes T CD4⁺ co-cultivés 24 heures avec des cellules dendritiques non traitées avec du PBS expriment un niveau basal détectable d'IFN- γ et d'IL-4 (courbes vertes). La co-culture avec des cellules dendritiques immatures traitées avec le peptide 251-265/I ne modifie pas de façon significative les niveaux d'IFN- γ et d'IL-4 dans les cellules T CD4⁺ (figure 21 A) alors que les cellules dendritiques immatures pulsées avec le peptide 251-265/II-III induisent une augmentation marquée du niveau d'expression de l'IFN- γ sans effet sur le niveau d'expression de l'IL-4 (figure 21 B).

En nous basant sur les résultats présentés dans la figure 20, nous avons alors voulu déterminer l'impact de la production différentielle de cytokines dans l'environnement immédiat des cellules dendritiques immatures traitées par les peptides d'intérêts sur la production d'IFN- γ par les cellules T. Pour cela, nous avons traité des cellules dendritiques immatures soit avec un anticorps monoclonal anti-IL-10 immédiatement après les avoir mises en contact avec le peptide 251-265/I soit avec un anticorps monoclonal anti-IL-12 pour les cellules dendritiques immatures pulsées avec le peptide 251-265/II-III. L'activation des lymphocytes T CD4⁺ lors de

la co-culture a pour conséquence une augmentation du niveau d'expression de l'IFN- γ quand la co-culture est réalisée avec des cellules dendritiques immatures pulsées avec le peptide 251-265/I en présence de l'anticorps anti-IL-10 (figure 21 C). A l'opposé, les cellules dendritiques pré-traitées par un anticorps anti-IL-12 avant d'être pulsées avec le peptide 251-265/II-III sont incapables d'induire une augmentation du niveau d'expression de l'IFN- γ par les lymphocytes T CD4⁺ (figure 21 D).

De l'ensemble de ces expériences de co-culture, il ressort que les peptides 251-265/I et 251-265/II-III utilisés dans nos conditions expérimentales initient une prolifération lymphocytaire T de faible intensité dans le cadre d'un mécanisme de présentation antigénique par les cellules dendritiques. Ceci est très probablement lié à la maturation partielle des cellules dendritiques activées par les peptides 251-265/I et 251-265/II-III et à une expression incomplète des molécules de co-stimulation. Les cellules dendritiques traitées avec le peptide 251-265/II-III sont cependant capables d'induire une augmentation de la production d'IFN- γ par les lymphocytes T alors que les cellules dendritiques pulsées avec le peptide 251-265/I n'ont pas cet effet inducteur. Les expériences de co-culture réalisées en présence d'anticorps anti-IL-10 et anti-IL-12 montre le rôle important des cytokines, induites de façon différentielles par les peptides, dans l'environnement des cellules dendritiques pour l'orientation de la réponse immune dépendante des lymphocytes T.

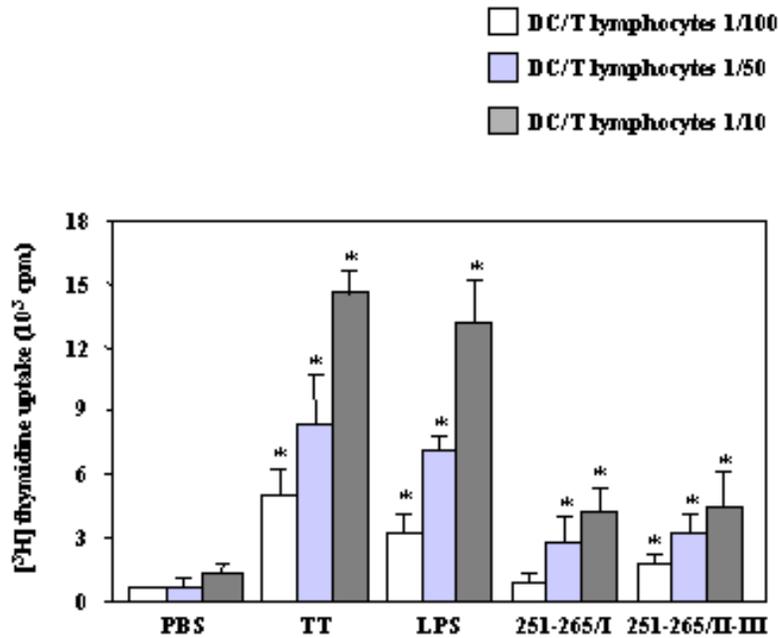
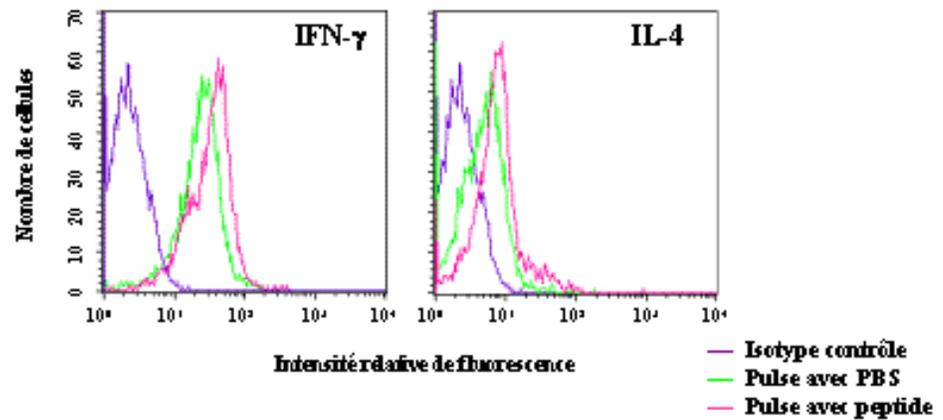


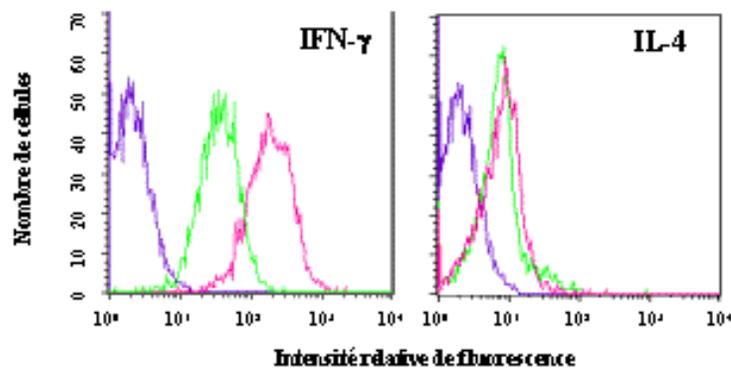
Figure 20 : Etude de la prolifération autologue lymphocytaire T dans des co-cultures utilisant des cellules dendritiques immatures pulsées avec les peptides 251-265/I ou 251-265/II-III*

* Les données des différents histogrammes présentent les valeurs moyennes, majoritairement accompagnées de leur déviation standard, déterminées à partir de trois expériences indépendantes réalisées avec les cellules de trois donneurs différents
 * $p < 0,05$ par rapport aux valeurs contrôles représentées par les cellules pulsées par le PBS

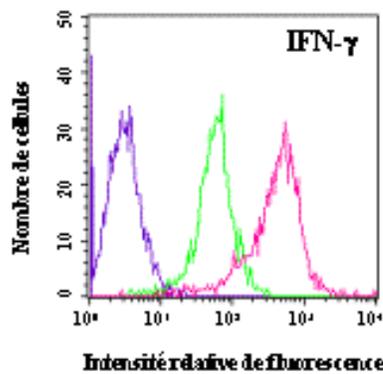
A : 251-265/I



B : 251-265/II-III



C : 251-265/I + anti-IL-10



D : 251-265/II-III + anti-IL-12

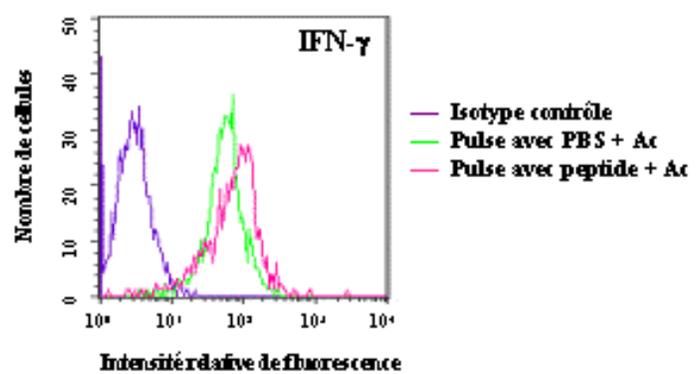


Figure 21 : Etude du niveau d'expression intracellulaire de l'IFN- γ et de l'IL-10 par des lymphocytes T CD4⁺ au cours de co-cultures avec des cellules dendritiques Immatures pulsées avec les peptides 251-265/I ou 251-265/II-III*

* Les résultats présentés sont ceux d'une expérience représentative extraite de trois expériences indépendantes réalisées avec les cellules de trois donneurs différents

Discussion

Les objectifs de notre travail ont été d'évaluer les propriétés immunogènes et antigéniques de peptides spécifiques d'allèles de la protéine de surface SAG1 de *T. gondii* et les différences observées lors de la présentation de ces peptides au système immunitaire, en modèle humain et murin.

Les peptides synthétiques représentant des régions de protéines peuvent induire des réponses cellulaires et humorales spécifiques à ces protéines (**Steward et Howard, 1987**). **Kong et coll. (2003)** ont démontré l'existence de sites antigéniques immunodominants et polymorphes chez *T. gondii*. **Lehmann et coll. (2000)** avaient rapporté que 6 des 7 substitutions présentes dans la région codante de SAG2 étaient non synonymes, indiquant que la sélection favorisant la diversité antigénique était intervenue sur ce locus. Pour le gène codant pour la protéine SAG1, un taux élevé de mutations non-synonymes (8 remplacements *vs* 2 silencieux) est également retrouvé dans sa région codante (**Bülow et Boothroyd, 1991**). De plus, ces sites de polymorphisme sont préférentiellement localisés dans la partie C-terminale de la protéine et permettent de discriminer les souches de type I des non I (**Howe et Sibley, 1995; He et coll., 2002**). Lors d'infections, la pression immunologique est principalement exercée sur ces zones antigéniques. Les différences de phénotype de virulence en modèle murin mais aussi humain entre les souches de type I et les autres, pourraient être liées à des différences de réponse du système immunitaire de l'hôte lors de la présentation d'antigènes spécifiques d'allèles.

Au moment de l'initiation de ce travail, l'état des connaissances identifiait le gène SAG1 comme principal support de la virulence chez le toxoplasme. Ainsi, **Sibley et Boothroyd (1992)** avaient montré qu'un allèle spécifique sur le locus SAG1 était corrélé à 100% au phénotype de virulence aiguë en modèle murin. En **1996, Windeck et Gross** ont montré que le niveau de transcription de SAG1 était augmenté significativement dans les souches virulentes pour la souris par rapport aux souches avirulentes, identifiant SAG1 comme un facteur de virulence de *T. gondii*. Nous avons sélectionné, à partir de souches de virulence différente, 2 peptides de SAG1 spécifiques d'allèles choisis en fonction de leur antigénicité maximale (**Alix,**

1999) et de leur polymorphisme (**Marlé, DEA biomolécules et dynamique cellulaire, 2001**).

La zone choisie pour la sélection des peptides avait déjà été identifiée comme possédant des propriétés antigéniques. Ainsi, **Godard et coll. (1994)** avaient montré en modèle animal que la réponse cellulaire T était essentiellement dirigée contre un peptide (238-256/I) que nous avons utilisé comme référence dans notre étude. En outre, **Biemans et coll. (1998)** avaient identifié cette région (238-253) comme étant un épitope cellulaire B alors qu'un peptide proche (261-276/I) n'était pas reconnu par des sérums humains ou animaux (**Kong et coll., 2003**).

Après avoir sélectionné les deux peptides spécifiques d'allèles (251-265/I et 251-265/II-III), il a été nécessaire de les coupler à la BSA afin d'obtenir une meilleure présentation, stabilité et sensibilité (**Moore et al, 1993**). Nous avons dans un premier temps évalué leur immunoréactivité vis-à-vis de sérums humains provenant de patients positifs ou négatifs pour la toxoplasmose.

Pour les toxoplasmoses acquises et congénitales, alors que les épitopes 251-265/I et 251-265/II-III ont une sensibilité globalement similaire, celle-ci est plus élevée pour les peptides spécifiques d'allèles que pour le peptide 238-256/I. Ainsi, un décalage de quelques AA est suffisant pour modifier l'immunoréactivité d'un peptide. Afin de déterminer si les peptides spécifiques d'allèles pouvaient être utilisés dans une approche de sérotypage, nous avons étudié des sérums pour lesquels le type de la souche incriminée était connu. Le ratio de l'index de ces peptides pour chaque échantillon permet d'établir un sérotypage partiel : un ratio inférieur à 0,8, pourrait être attribué aux sérums d'enfants infectés par une souche de type II. Néanmoins un ratio supérieur, n'autorise pas le sérotypage. Le biais d'échantillonnage (faible nombre de sérums typés et majorité due à une infection par une souche de type II) ne permet pas d'appréhender la capacité des peptides à distinguer entre sérotype I et non I.

Dans un second temps, nous avons étudié réponse immune après immunisation par les différents peptides et évalué leur effet protecteur en modèle murin de toxoplasmose aiguë (souche virulente) et chronique (souche avirulente).

Après immunisation et avant infestation, les sérums de souris immunisées avec les peptides 251-265/I et 251-265/II-III n'induisent pas de réponse contrairement au peptide 238-256/I que ce soit en ELISA, en western blot ou en immunofluorescence. Dans l'étude de **Godard et coll. (1994)**, le peptide 238-256/I était employé à 50 µg en sous cutané chez le rat. La dose employée (20 µg) lors des immunisations successives ne nous paraît pas responsable de cette absence de réponse puisque le peptide 238-256/I utilisé à la même dose induit la synthèse d'anticorps. En outre, cette dose de 20 µg a été employée dans un protocole d'immunisation peptidique dérivé de la protéine SAG1 avec succès en présence d'adjuvant de Freund chez la souris (**Velge-Roussel et coll., 1997**). L'absence de synthèse d'anticorps pourrait être due aux souris utilisées, **Velge-Roussel et coll. (1997)** ayant rapporté des différences entre souris pour un même protocole d'immunisation. L'effet de la vaccination semble être contrôlé par le fond génétique de la souris (**Letscher-Bru et coll., 2003**). Des études d'immunisation peptidique sur des souris Swiss dans le modèle *Toxoplasma* n'ont pas encore été décrites même si elles ont déjà été utilisées pour des essais de protection (**Lunden et coll., 1993 ; Bülow et Boothroyd, 1991**). Le choix de ces souris pourrait être responsable du manque de réponse humorale aux peptides sélectionnés après immunisation.

L'inoculation par voie intrapéritonéale a été choisie car, bien que ne représentant pas le mode habituel de contamination, elle permet la standardisation et la reproductibilité de l'infestation. Après infestation, nous montrons que l'infection à *T. gondii* induit une réponse immunologique importante. Les anticorps anti-SAG1 étaient observés dans tous les sérums d'animaux infestés.

Nous nous sommes intéressés à la capacité des peptides à générer une réponse immune de type Th-1 ou Th-2 après trois immunisations successives. Les isotypes des anticorps produits sont des indicateurs de l'orientation de la réponse immune. L'IFN- γ sécrété par les cellules Th-1, favorise le « switch » des IgG2a, alors que le « switch » des IgG1 est régulé par l'IL-4 produite par les cellules Th-2.

Avant infestation, seules les souris immunisées avec le peptide 238-256/I synthétisent un taux d'IgG1 et d'IgG2a significatif notamment pour les IgG1 avec une réponse orientée Th-2 principalement. Les peptides spécifiques d'allèles n'entraînent pas de synthèse d'anticorps spécifiques objectivable par notre technique Elisa.

Après infestation, nous montrons pour les souris immunisées avec les peptides spécifiques d'allèles, une augmentation significative d'IgG2a sans IgG1 suggérant qu'ils entraînent une réponse spécifique Th-1 *in vivo*. Par contre, les souris immunisées avec le peptide 238-256/I montrent des anticorps IgG1 et IgG2a sans orientation prédominante. Nos résultats rappellent ceux rapportés par **Godard et coll. (1994)** qui montrent que 4 peptides de SAG1 produisent une immunité de type Th-2 (production exclusive d'IgG1) alors que seul le peptide 238-256/I est capable d'induire des isotypes multiples.

L'immunisation avec de l'ADN codant pour SAG1 semble induire la synthèse d'IgG1 et IgG2a (**Nielsen et coll., 1999; Leyva et coll., 2001**) alors que la réponse est exclusivement de type IgG1 lors d'une immunisation avec la protéine SAG1 recombinante (**Petersen et coll., 1998; Letscher-Bru et coll., 1998**). Dans notre étude, les souris Swiss développent une réponse de type Th-1 naturellement observée lors d'une infection à *T. gondii* (**Nielsen et coll., 1999**).

Par Western blot, nous avons montré que cette réponse immune était dirigée contre un constituant de la protéine SAG1.

Le développement d'un vaccin est basé sur l'observation qu'une première exposition à *T. gondii* conduit à une complète résistance à une infestation secondaire (**Araujo, 1994; Jenkins, 2001**). Plusieurs études ont montré que l'utilisation de tachyzoïtes, d'extraits d'antigènes spécifiques (SAG1) ou de peptides, confère une protection contre un e de *T. gondii* chez le rat ou la souris. L'immunisation par la protéine SAG1 recombinante, native ou associée, est décrite comme protectrice (**Bülow et Boothroyd, 1991; Debard et coll., 1996; Petersen et coll., 1998; Biemans et coll., 1998; Nielsen et coll., 1999; Angus et coll., 2000 ; Couper et**

coll., 2003; Seng et coll., 2004). Cette protection peut être appréciée par la diminution du nombre de kystes dans les cerveaux ou par une augmentation du taux de survie. Il est pourtant difficile de comparer des études utilisant des types de souris, des souches, des adjuvants ou des voies d'inoculation différents.

Dans notre étude, aucun peptide n'a engendré de protection lors d'une infestation par la souche virulente RH. Quelle que soit la dose de peptides utilisée pour l'immunisation, toutes les souris sont décédées à la fin de la première semaine suivant l'infestation par 1000 tachyzoïtes de la souches RH, montrant l'inefficacité de nos peptides à protéger les souris d'une infestation par une souche virulente.

Nous avons ensuite testé l'effet protecteur des peptides dans un modèle de toxoplasmose murine avirulente. Par comptage microscopique, nous avons objectivé une diminution du nombre de kystes intracérébraux chez les souris immunisées avec les peptides spécifiques d'allèles, significative pour le peptide 251-265/II-III. Nous observons un nombre augmenté de kystes pour les immunisations avec le peptide 238-256/I et l'adjuvant. Une augmentation du nombre de kystes chez des souris immunisées avec la protéine SAG1 purifiée, native et infestées avec une souche avirulente, a déjà été rapportée par **Kasper et coll. (1985)**. Le même ordre de résultat est retrouvé par PCR quantitative, permettant de valider cette nouvelle approche dans l'estimation de la charge parasitaire. Elle offre l'avantage d'être moins fastidieuse que le comptage microscopique.

L'immunisation avec la protéine SAG1 recombinante seule, avant infestation par la souche PRU, ne modifie pas le nombre de kystes par rapport aux souris contrôles (**Letscher-Bru et coll., 1998**). **Debard et coll. (1996)**, confirment le manque de protection fourni par la protéine naturelle SAG1 en terme de charge parasitaire intracérébrale. L'immunisation combinée avec un adjuvant et la protéine redirige l'immunité vers un modèle prédominant cellulaire et humoral de type Th-1 et réduit alors la charge parasitaire (**Letscher-Bru et coll., 1998; Debard et coll., 1996**). L'absence d'anticorps détectable avant infestation ne permet pas

d'établir de corrélation entre les titres des anticorps spécifiques anti-peptides dérivés de SAG1 avant infestation et la protection. Le rôle réel des anticorps dans l'infection à *T. gondii* est d'ailleurs controversé comme l'ont rapporté **Haumont et coll. (2000)**. Cependant, d'autres études *in vivo* et *in vitro*, indiquent que la réponse humorale participerait à la réponse protectrice (**Mineo et coll., 1993; Velge-Roussel et coll., 2001; Petersen et coll., 1998**). L'existence d'une protection partielle n'est retrouvée que pour les souris immunisées avec les deux peptides spécifiques d'allèles qui présentent un profil de réponse humorale à orientation Th-1 (présence d'IgG2a en l'absence d'IgG1). Les souris immunisées par le peptide 238-256/I, présentant des anticorps d'isotypes IgG1 et IgG2a, n'ont pas entraîné de réduction du nombre de kystes, présentant même une augmentation de la charge parasitaire par rapport aux souris contrôles.

La maturation et l'activation des cellules dendritiques par *T. gondii* sont des étapes essentielles pour le développement d'une réponse immune cellulaire protectrice. La maturation et l'activation des cellules dendritiques sont caractérisées 1/ par l'expression conjointes des molécules de co-stimulation CD80/CD86 et du marqueur de maturation CD83 et 2/ par leur capacité à produire des cytokines proinflammatoires telle que l'IL-12 dont la production est cruciale au cours de la toxoplasmose pour promouvoir le développement de populations lymphocytaires T de type Th-1 productrices d'IFN- γ (**Gazzinelli et coll., 1994; Hunter et coll., 1995 b**). Dans le modèle murin, le toxoplasme a été démontré comme infectant préférentiellement les cellules dendritiques immatures (**McKee et coll., 2004**), et la protéine SAG1, structure antigénique majeur du toxoplasme, a été décrite comme impliquée d'une part dans la production d'IL-12 par les cellules dendritiques et d'autre part dans la capacité des lymphocytes T CD4⁺ à induire une réponse immunitaire de type Th-1 (**Rachinel et coll., 2004**). Dans le cadre de ce travail, nous avons émis l'hypothèse que des peptides dérivés de deux allèles différents de SAG1 et permettant de distinguer des souches virulentes de type I (peptide

251-265/I) de souches non virulentes de type II et III (peptide 251-265/II-III) pouvaient contribuer à une régulation différentielle des fonctions des cellules dendritiques humaines immatures.

Nous avons montré que les peptides 251-265/I et 251-265/II-III induisent une maturation associée à une activation des cellules dendritiques humaines immatures. La maturation induite par les peptides a été déterminée au travers de l'augmentation du niveau d'expression des molécules CD80 et CD83. Cependant, les deux peptides utilisés dans notre étude sont incapables de promouvoir une maturation complète des cellules dendritiques puisque 48 heures après le traitement par les deux peptides, moins de 60% des cellules dendritiques traitées expriment fortement le marqueur de maturation CD83. Plusieurs données de la littérature ont démontré que *T. gondii* infecte les cellules dendritiques humaines immatures en induisant soit une maturation incomplète soit dans certains cas une absence totale de maturation des cellules dendritiques (**Subauste et Wessendarp, 2000; Mc Kee et coll., 2004 ; Giese et coll., 2004**) et que des extraits solubles de *T. gondii* participent également de façon notable à la maturation des cellules dendritiques murines (**Mc Kee et coll., 2004**). Les résultats que nous avons obtenus, corroborent les données sur l'implication de *T. gondii* dans la maturation, même partielle, des cellules dendritiques immatures. Cependant, à notre connaissance, les résultats que nous présentons, montrent pour la première fois une implication de peptides issus de *T. gondii* et en particulier de peptides dérivés de l'antigène SAG1 dans la maturation des cellules dendritiques humaines. Il est à noter que les deux peptides utilisés dans notre étude ont une capacité identique à induire une maturation partielle des cellules dendritiques humaines. Récemment, les travaux de **Diana et coll.** ont démontré que la maturation des cellules dendritiques humaines n'était observée qu'au cours d'une infection par des souches de type I de *T. gondii* alors que l'infection par des souches de type II conduisait à la production d'un facteur soluble par le parasite, facteur responsable de l'absence de maturation des cellules dendritiques (**Diana et coll., 2004**). Nos propres données mettent en évidence que,

indépendamment de facteurs solubles inhibiteurs sécrétés par le parasite entier, des peptides dérivés de SAG1 discriminant des souches de type I de souches de type II et III contribuent de façon identique à la maturation des cellules dendritiques.

L'activation des cellules dendritiques immatures par les peptides a, quant à elle, été démontrée au travers de l'augmentation de la production de cytokines proinflammatoires (TNF- α , IL-6), ainsi que de l'IL-12 et de l'IL-10. Ainsi, nous avons montré que l'activation par le peptide 251-265/I induit des niveaux de production de cytokines comparables ou supérieurs à ceux induits par le LPS, exception faite de l'IL-12 et du TNF- α dont les niveaux de production sont significativement inférieurs à ceux induits par le LPS. A l'opposé, alors que la production d'IL-12 et de TNF- α induite par le peptide 251-265/II-III est comparable à celle induite par le LPS, la production d'IL-6 et d'IL-10 est très nettement inférieure. En outre, les deux peptides utilisés dans notre étude régulent différemment le niveau de production de cytokines dans le micro-environnement des cellules dendritiques immatures. Ainsi, nos résultats ajoutent un nouvel argument en faveur de l'adaptation des fonctions des cellules dendritiques myéloïdes en fonction des conditions environnementales, représentées ici par une imprégnation peptidique différente, qu'elles rencontrent aux sites de leur maturation comme cela a déjà été décrit dans la littérature (**Kalinski et coll., 1999; Vieira et coll., 2000**). De nombreux facteurs, en particulier des facteurs d'origine virale ou bactérienne, polarisant les cellules dendritiques vers un profil de type 1 ou de type 2 ont été respectivement identifiés comme augmentant (**Biron, 1997; Hilkens et coll., 1997; Verhasselt et coll., 1997; Cella et coll., 1999**) ou diminuant (**Kalinski et coll., 1998; Panina-Bordignon et coll., 1997; Van der Pouw Kraan et coll., 1998**) la capacité des cellules dendritiques à produire de l'IL-12. Dans l'étude que nous avons menée, nous montrons que l'exposition de cellules dendritiques humaines immatures à deux peptides alléliques issus de l'antigène SAG1 de *T. gondii* a pour conséquence une production différentielle non seulement d'IL-12 mais également de TNF- α ,

d'IL-6 et d'IL-10, ce qui suggère un rôle potentiel de ces deux peptides dans la polarisation cytokinique des cellules dendritiques. Ainsi, le peptide 251-265/I semble contribuer préférentiellement au développement de cellules dendritiques polarisées vers un profil de type 2 dominé par une production prédominante d'IL-6 et d'IL-10 en comparaison du peptide 251-265/II-III qui apparaît plus efficace à initier le développement des cellules dendritiques vers un profil de type 1 au travers d'une forte production majoritaire d'IL-12 et de TNF- α . Cependant, la production significative d'IL-12 induite par le peptide 251-265/I après activation des cellules dendritiques bien que plus faible que celle de l'IL-6 et de l'IL-10 doit également être prise en compte dans les effets du peptide 251-265/I. Ainsi, il apparaît que l'influence du peptide 251-265/I sur les fonctions des cellules dendritiques est très probablement la conséquence d'un équilibre subtil entre la production de cytokines de type 1 et de type 2 dans l'environnement immédiat de ces cellules.

La production d'IL-12 par les cellules dendritiques est d'une importance majeure dans l'orientation vers un profil de type Th-1 de la réponse immune (**Mosmann et Sad, 1996; O'Garra, 1998**), alors que la production d'IL-10, décrite comme inhibant la production d'IL-12 sous sa forme bioactive (**Corinti et coll., 2001**), favorise une polarisation de la réponse immune vers un profil de type Th-2. Les résultats que nous avons obtenus au cours de notre étude confirme le rôle central de la production de ces deux cytokines par les cellules dendritiques dans l'orientation de la réponse immune. En effet, nous avons montré que l'incapacité des cellules dendritiques immatures, pulsées par le peptide 251-265/I, à orienter les lymphocytes T CD4⁺ vers une réponse de type Th-1 (IFN- γ) ou Th-2 (IL-4) était levée lors du pré-traitement des cellules dendritiques immatures pulsées par un anticorps monoclonal dirigé contre l'IL-10. Ce pré-traitement a pour conséquence une augmentation du niveau de production de l'IFN- γ par les cellules T CD4⁺ en co-culture avec les cellules dendritiques pulsées par le peptide 251-265/I, c'est à dire une polarisation de la réponse immune vers un profil de type Th-1. Au regard de ces résultats, nous avons émis l'hypothèse que la production

d'IL-10 concomitante de celle de l'IL-12 lors du pulse des cellules dendritiques par le peptide 251-265/I exerçait un effet de contrôle négatif de la production d'IL-12 sous sa forme bioactive (**Corinti et coll., 2001**). Le traitement par un anticorps anti-IL-10 levant cette inhibition, l'IL-12 synthétisée sous sa forme active peut alors induire une polarisation de type Th-1 des cellules T. Cette hypothèse est confirmée par les résultats obtenus lors du pulse des cellules dendritiques immatures par le peptide 251-265/II-III. En effet, dans ce contexte expérimental d'activation des cellules dendritiques, la production d'IL-10 est négligeable. De fait, nous avons montré que les cellules dendritiques pulsées avec le peptide 251-265/II-III induisent une production significative d'IFN- γ par les cellules T CD4⁺ et orientent la réponse T vers une réponse de type Th-1. Le pré-traitement par un anticorps monoclonal anti-IL-12 des cellules dendritiques immatures pulsées avec le peptide 251-265/II-III, inhibent l'effet de l'IL-12 sur la production d'IFN- γ par les cellules T et donc l'orientation Th-1 de la réponse immune, confirmant dans notre système expérimental le rôle central de l'IL-12. La signification physiopathologique de l'orientation de la réponse immune par les peptides dérivés de SAG1 pourrait être corrélée aux phénotypes de virulence des souches de *T. gondii*. Dans cette hypothèse, le peptide 251-265/II-III qui est apparenté aux souches avirulentes de type II et III pourrait probablement avoir des effets bénéfiques sur le développement de la réponse Th-1 décrite comme initiant une immunité protectrice alors que le peptide 251-265/I qui est apparenté aux souches virulentes de type I n'aurait pas cet effet. Il est important de noter que l'IL-10 sécrétée par les cellules dendritiques pourrait agir comme une cytokine clé dans la virulence des souches de *T. gondii* même si cette cytokine a été décrite comme ne participant pas à la pathogénie de la souche virulente RH (**Wille et coll., 2004**).

Cependant, il doit être noté que les peptides 251-265/I et 251-265/II-III ne peuvent être considérés comme des signaux puissants de la prolifération des lymphocytes T CD4⁺, ce qui reflète une capacité intrinsèque modérée à moduler la réponse cellulaire T dans le contexte d'un mécanisme de présentation antigénique. Les faibles réponses prolifératives observées,

peuvent s'expliquer d'une part par la maturation incomplète des cellules dendritiques pulsées par les peptides et d'autre part par la nature des cytokines présentes dans le micro-environnement des cellules dendritiques. La maturation incomplète des cellules dendritiques pulsées par les peptides représente un élément clé pour que les cellules dendritiques se comportent comme de puissants activateurs de la croissance lymphocytaire T (**Lutz et Schuler, 2002**). Ainsi, Le TNF- α , dont la production par les cellules dendritiques est induite par les deux peptides, diminue la capacité des cellules dendritiques à stimuler la prolifération des lymphocytes T CD4⁺ (**Sallusto et coll., 1995**).

Nos résultats montrent que :

1/ les peptides 251-265/I et 251-265/II-III participent à une maturation partielle des cellules dendritiques immatures qui s'accompagne d'une faible capacité à induire la prolifération lymphocytaire au cours des mécanismes de présentation par les cellules dendritiques,

2/ les peptides 251-265/I et 251-265/II-III induisent une production différentielle de cytokines par les cellules dendritiques leur conférant un rôle probable de facteur de polarisation s'apparentant clairement à une polarisation de type 1 pour le peptide 251-265/II-III mais plus incertaine pour le peptide 251-265/I (équilibre subtil entre la production d'IL-10 et d'IL-12 induite par ce peptide),

3/ les cellules dendritiques polarisées vers un profil de type 1 par le peptide 251-265/II-III orientent la réponse immune vers une réponse de type Th-1 alors que les cellules dendritiques immatures activées par le peptide 251-265/I ne peuvent orienter la réponse cellulaire T vers un profil déterminé,

4/ par la polarisation vers un profil de type 1 des cellules dendritiques qu'il active et donc par l'initiation d'une réponse cellulaire, le peptide 251-265/II-III participe très probablement au caractère non virulent des souches de types II et III auxquelles il est apparenté

5/ le peptide 251-265/I ne participe pas à l'atténuation de la virulence des souches de type I auxquelles il est apparenté.

Au total, notre travail illustre le rôle critique de peptides spécifiques d'allèles de SAG1 dans l'orientation de la réponse cellulaire T par l'induction de la production de cytokines par les cellules dendritiques. Ceci est d'autant plus important que l'évolution physiopathologique de l'infection à *T. gondii* dépend fortement de la polarisation cytokinique des cellules dendritiques précocement en contact avec l'agent pathogène aux sites d'infection.

Perspectives

Les résultats obtenus avec les peptides spécifiques d'allèles de SAG1 ont laissé entrevoir des possibilités d'application en sérotypage. Les travaux de **Kong et coll. (2003)** ont suggéré la nécessité d'identifier d'autres marqueurs en vue d'un sérotypage complet. Aussi, nous sommes intéressés au gène GRA7, récemment décrit (**Fischer et coll., 1998 ; Jacobs et coll., 1998**) sur lequel nous avons déjà initié des recherches et dont nous avons évalué l'utilité du polymorphisme de séquence comme marqueur de typage de *T.gondii*.

Le gène GRA7 est un gène simple copie sans intron. Il contient trois sites de clivage putatifs, un site potentiel de N-glycosylation et un domaine transmembranaire putatif hydrophobe de 29 acides aminés dans la partie C-terminale (**Jacobs et coll., 1998; Fischer et coll., 1998**). Il n'existe aucune homologie de séquences entre GRA7 et les autres protéines de granules denses. La protéine GRA7 est exprimée à tous les stades du parasite (tachyzoïte, bradyzoïte, mérozoïte et sporozoïte) et représente 0,5% des protéines totales de *T.gondii* (**Ferguson, 2004**). Au stade tachyzoïte, elle est libérée des granules denses via le réseau intravacuolaire de la vacuole parasitophore lors de l'invasion de la cellule hôte (**Bonhomme et coll., 1998**). Ces propriétés ont été exploitées dans le sérodiagnostic (**Aubert et coll., 2000; Neudeck et coll., 2002; Kong et coll., 2003; Pietkiewicz et coll., 2004**) et la vaccination (protection partielle contre une infestation létale) (**Vercammen et coll., 2000**). Un titre élevé d'anticorps anti-GRA7 est retrouvé lors de la phase aiguë de l'infection (**Jacobs et coll., 1999**). Enfin, il semblerait que le niveau d'expression de GRA7 soit corrélé avec la virulence de *T.gondii* (**Neudeck et coll., 2002**).

Nous avons amplifié, séquencé et comparé la zone codante de GRA7 pour 27 souches de *T.gondii* (représentatives des souches de type I, II, III et atypiques ou recombinantes, Tableau 11). Parallèlement, les données des séquences du gène GRA7 des souches WIK (N° GenBank U79158) et BK (N° GenBank Y13863) ont été utilisées.

Tableau 11 : Souches de *T. gondii*

Souches	Origine	Clinique	SAG1/SAG2	microsatellites	Type
RH	USA, 1939	Encéphalite	I	I ^a	I
BK	Pays Bas, 1948	TC létale	I	I ^a	I
CIBMUQ/HDC	Colombie, 2002	TC	I	I ^a	I
RMS-03-DJON	France, 2003	TR	I	I ^a	I
PRU	France, 1964	TC létale	II	II ^a	II
RMS-1995-ABE	France, 1995	TC	II	II ^b	II
RMS-1999-GUI	France, 1999	TC	II	II ^b	II
RMS-1999-BES	France, 1999	TC	II	II ^b	II
RMS-2000-GIL	France, 2000	TC	II	II ^b	II
RMS-2000-TRA	France, 2000	TC	II	II ^b	II
RMS-2000-BAR	France, 2000	TC	II	II ^b	II
RMS-2000-WAU	France, 2000	TC	II	II ^b	II
RMS-2001-GRA	France, 2001	TC	II	II ^b	II
RMS-04-SAN	France, 2004	asymptomatique	II	II	II
RMS-04-CHE	France, 2004	asymptomatique	II	II	II
TOU-04-MON	France, 2004	TC	II	II	II
C56	USA, 1962	asymptomatique	III	III	III
NED	France, 1982	TC	III	III ^a	III
RMS-1997-PAR	France, 1997	TC	III	III ^b	III
RUB	Guyane, 1992	TAD	I	Atypique ^a	Atypique ^a
GUY-2001-DOS	Guyane, 2001	TC	I	Atypique ^a	Atypique ^a
GUY-2004-LAB	Guyane, 2004	TAD	I	Atypique ^a	Atypique ^a
MAS	France, 1991	TC	I	Atypique ^a	Atypique ^a
GRE-00-BRA	France, 2004	TC	II	Atypique ^a	Atypique ^a
WIK	Afrique, ?	?	I	I/III ^a	Recombinant
TONT	France, 1992	TC	I	III* ^a	Recombinant
RMS-1994-LEF	France, 1995	TC	I	III/I* ^b	Recombinant
RMS-2001-MAU	France	TC	II	II/I* ou I/III* ^a	Recombinant
MAR-00-HOU	France, 2000	TC létale	I	III/II/I	Recombinant

(* indique la présence d'un allèle atypique, ^a Ajzenberg et coll., 2002b ou 2004, ^b Centre de Ressources Biologiques)

TC : Toxoplasmose congénitale, TAD : Toxoplasmose acquise disséminée, souches animales en grisé.

Deux amorces ont été sélectionnées à partir de la séquence décrite par **Fischer et coll. (1998)** (positions 113-133 et 932-912 respectivement) : primer A, 5'-ACCCTATAT-TGGGGCTTGCT-3' et primer B, 5'- ACACTGTCCTCGAGCTCCTA -3'.

La PCR a été effectuée avec 20 ng d'ADN extrait dans un volume réactionnel final de 50 µl. Brièvement, le mélange réactionnel contient 10 mM de Tris-HCl, 50 mM de KCl, 2mM de MgCl₂, 200 µM de dNTP's, 1µM de chaque amorce et 1,25 U de polymérase. L'amplification se décompose en trois étapes de 30 secondes répétées 40 fois: dénaturation à 94°C, hybridation à 60°C et élongation à 72 °C. Les amplifiats ont été analysés sur gel d'agarose à 2%. Après amplification par PCR de la région codante, les amplifiats ont été purifiés et séquencés et les séquences alignées en utilisant le logiciel ClustalW (ebi.ac.uk).

Les produits amplifiés avec les 2 amorces ont été digérés avec l'enzyme BstF51 à 65°C et avec les enzymes EcoRI et MboII à 37°C pendant 4 heures. Le milieu réactionnel (volume de 50µl) contient 20 µl d'ADN amplifié et 0,2U d'enzyme. Les fragments obtenus après digestions ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,6 %.

Nous avons obtenu les résultats suivants :

La taille du fragment amplifié du gène GRA7 est de 761 pb pour toutes les souches exceptée pour la souche RMS-2001-MAU (758 pb). L'alignement des séquences montre 26 sites variables correspondant à 1 délétion de 3 pb et 25 substitutions nucléotidiques (Tableau 12). La délétion de 3 pb se situe en position 466-468 au niveau de la séquence de la souche RMS-2001-MAU. Vingt-trois des 25 substitutions induisent un changement d'acides aminés (les mutations en position 267 et 549 sont silencieuses).

Tableau 12: Sites de polymorphisme au niveau des nucléotides et des acides aminés pour la région codante du gène GRA7.

Positions des nucléotides variables																										
	200	267	290	465-469	493	520	549	655	658	676	685	686	693	703	709	721	722	730	758	772	778	782	836	843	862	868
RH [Ⓜ]	C	A	T	AGAAG	C	A	G	C	G	G	A	G	C	A	G	G	G	T	C	A	C	C	T	A	G	G
PRU ^{&}	T	A	A	C	C	.	C	A	.	.	A	A	.	
RMS-2001-MAU	T	.	.	A---G	.	.	A	A	C	C	.	C	A	.	.	A
RUB ^Ω	T	.	C	A	A	C	C	G	C	A	.	A	A	A
MAS [☼]	T	G	C	A	A	C	C	.	C	.	T	.	A	.	A	T	C	A	A	C	C	.	A
NED [°]	T	G	G	C	A	A	C	C	.	C	.	T	.	A	.	A	T	C	A	A	C	C	.	A

Positions des nucléotides variables																							
	200	290	465-469	493	520	655	658	676	685-686	693	703	709	721-722	730	758	772	778	782	836	843	862	868	
Changement d'acides aminés correspondant																							
	8	38	97	106	115	160	161	167	170	172	176	178	182	185	194	199	201	202	220	222	229	231	
RH [Ⓜ]	S	I	E	R	N	L	V	E	R	D	T	G	G	L	A	M	L	T	L	Q	E	G	
PRU ^{&}	F	I	L	Q	T	E	.	.	S	L	.	
RMS-2001-MAU	F	.	-	.	.	I	L	Q	T	E	.	.	S	
RUB ^Ω	F	T	.	.	.	I	L	Q	T	E	.	S	N	
MAS [☼]	F	.	.	G	H	I	L	Q	T	.	S	.	S	I	V	L	I	K	P	H	.	R	
NED [°]	F	.	.	G	H	I	L	Q	T	.	S	.	S	I	V	L	I	K	P	H	.	R	

[Ⓜ] RH et souches de type I, [&] PRU et souches de type II, [°] NED et souches de type III.

^Ω RUB et souches guyanaises

[☼] MAS, RMS-1994-LEF et MAR-00-HOU

Nous avons établi une classification sous la forme d'un arbre à partir des polymorphismes existants sur les séquences grâce au logiciel ClustalW. Ce dernier aligne les séquences 2 à 2, puis regroupe ces alignements en « clusters » et enfin, effectue des combinaisons des alignements 2 à 2 pour obtenir un alignement multiple. Le dendrogramme obtenu regroupe les séquences en fonction de leur similarité et met en évidence 6 groupes. Ces données nous ont permis de réaliser un arbre phylogénique (Figure 22).

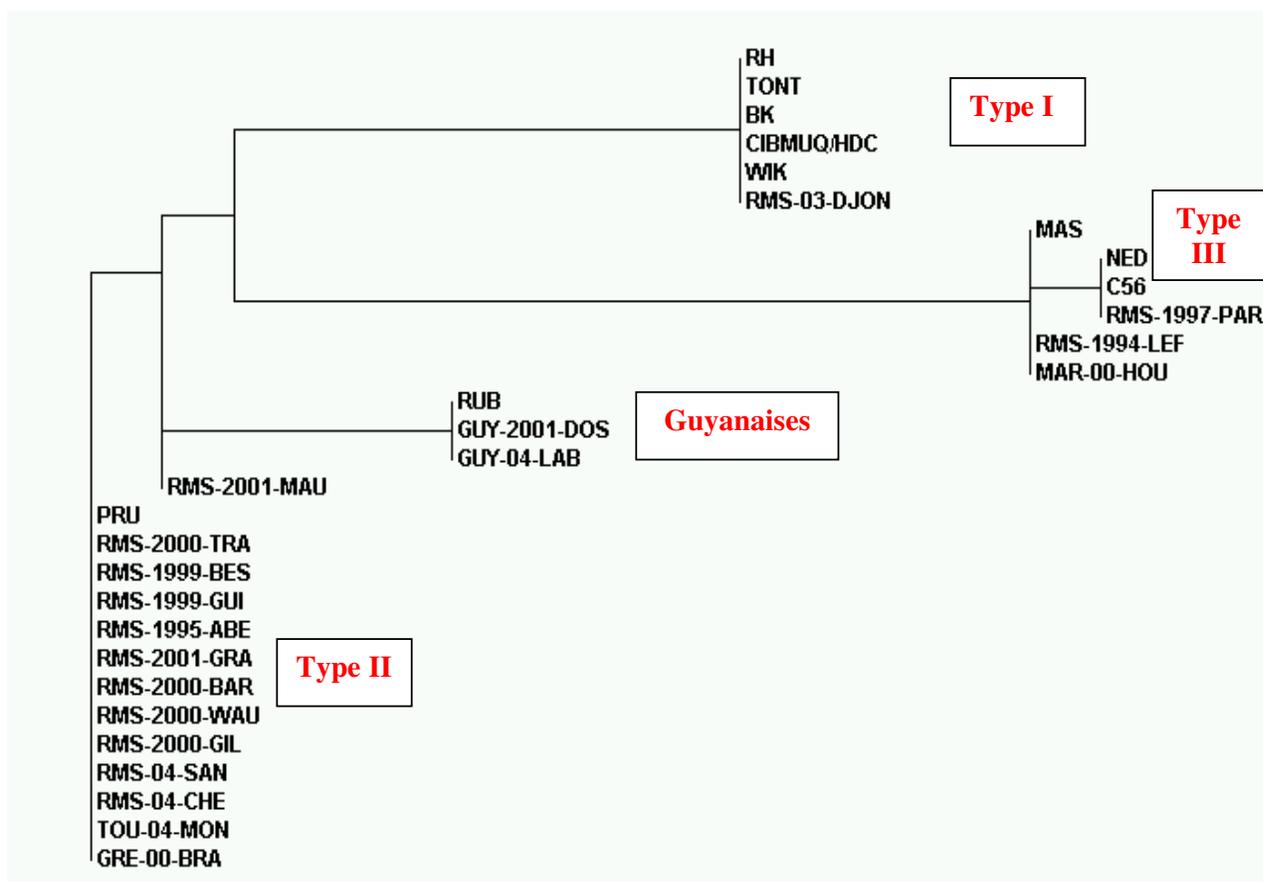


Figure 22 : Arbre phylogénique sur la base des alignements de 29 séquences de GRA7.

Douze sites de polymorphisme permettent de séparer les types III des autres types. Seul un site permet de différencier les souches de type III et celles appartenant au cluster MAS. Cependant, la mutation en 267 étant silencieuse, ces souches sont indifférenciables au niveau protéique. Huit sites de polymorphisme permettent de séparer les types I des autres types (dont une mutation silencieuse en position 549) alors que, respectivement, 4 et 1 site séparent le

groupe des souches guyanaises et les types II (position 868) des autres souches. La souche RMS-2001-MAU n'est différenciée des souches de type II que par la délétion de l'acide aminé en position 97.

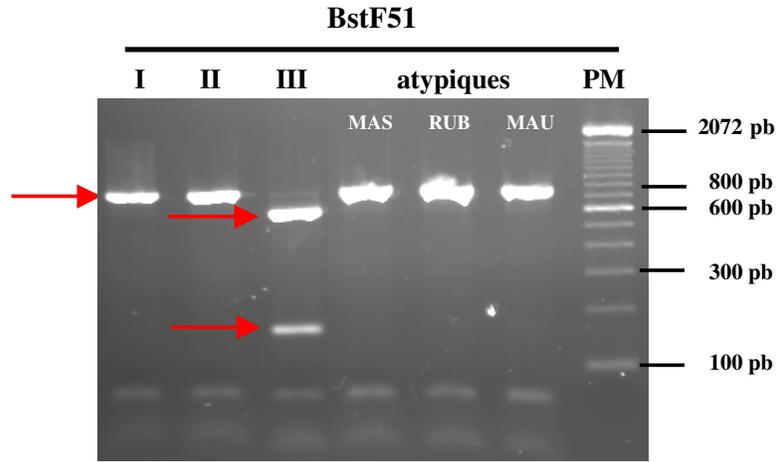
Les sites de polymorphisme sont dus à des substitutions nucléotidiques ou à des délétions qui ont pour conséquence de faire apparaître de nouveaux sites de restriction pour des enzymes. L'utilisation de ces dernières génère des profils différents suivant la souche permettant ainsi de différencier celles-ci. La digestion des produits d'amplification par l'enzyme de restriction BstF51 permet de distinguer les souches de type III des I et II (Figure 23A) par coupure au niveau de l'unique site de polymorphisme permettant de séparer les souches de type III pures (d'après les résultats de typage multigénique) des souches du cluster MAS. L'utilisation des enzymes MboII et EcoRI sur le même amplifiat mène à la distinction des types I, II et des autres groupes (type III et MAS, souches guyanaises et MAU, Figure 23B). La combinaison des résultats de ces RFLP permet de classer les souches en type I, II, III et atypiques (Tableau 13 et Figure 23). Parmi les atypiques, nous pouvons distinguer les souches guyanaises et la souche RMS-2001-MAU par coupures et les souches type MAS par déduction des deux RFLP.

L'utilisation d'enzymes de restriction sur le gène de la protéine GRA7 met en évidence 6 allèles.

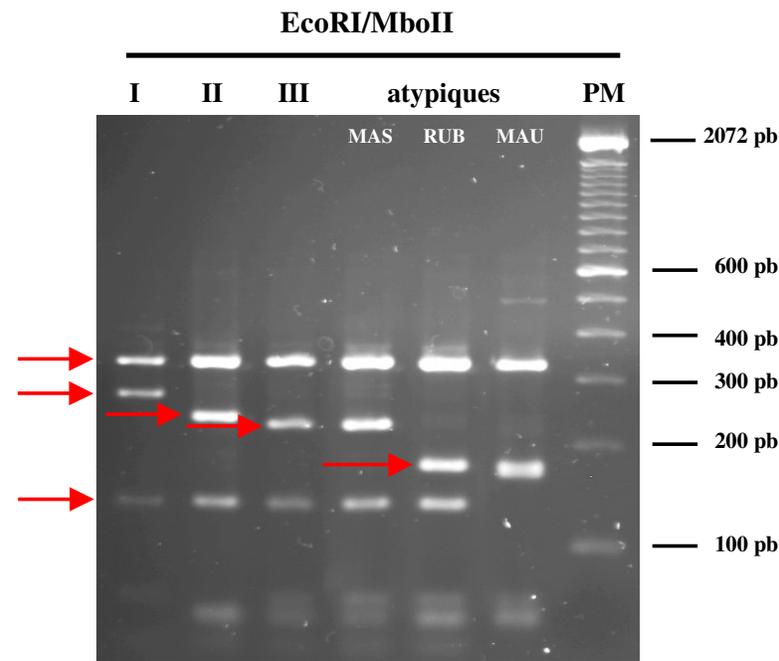
Tableau 13 : Analyse par RFLP-PCR de la zone codante du gène GRA7.

Enzymes de restriction	I	II	III	Atypiques		
				RMS-2001-MAU	MAS	Guyanaises
BstF51	-	-	+	-	-	-
EcoRI/MboII	330-265-134	330-233-134	330-220-134	330-171-169	330- 220- 134	330-171-134

L'enzyme de restriction coupe + ou non - la séquence amplifiée.



A.



B.

Figure 23 : Typage des souches par RFLP-PCR.

A. Digestion par BstF51. B.. Digestion par EcoRI et MboII. La digestion des amplifiats par BstF51 sépare les III des types I, II et des atypiques. EcoRI et MboII distinguent les types I (RH), les types II (PRU) et certaines atypiques.

Nous avons mis en évidence 25 sites de polymorphisme (3.4%), taux relativement important pour un gène de *T.gondii* où l'ensemble du polymorphisme est estimé à 1 à 2 % (**Howe et Sibley, 1995**). Nous avons également mis en évidence une délétion de 3 nucléotides pour une souche possédant la particularité d'être virulente pour la souris. Pour GRA7, hormis cette délétion, l'ensemble du gène analysé a montré une parfaite superposition avec les souches de type II. De façon intéressante, pour le gène SAG1, cette souche présente le génotype d'une souche de type X associé à une pathogénie exacerbée chez des loutres de mer (**Miller et coll., 2004**). Vingt-trois des 25 substitutions induisent un changement d'AA.

La connaissance des sites de polymorphisme nous a permis de développer une technique de PCR-RFLP qui sépare, en seulement 2 étapes, les six allèles retrouvés par séquençage. La diversité allélique identifiée pour GRA7 par notre technique de PCR-RFLP est à comparer avec la diversité allélique faible détectée par les techniques isoenzymatiques ou PCR-RFLP (2 à 4 allèles pour la majorité par marqueurs) (**Dardé, 2004**).

Les sites de polymorphisme sont répartis sur toute la séquence du gène avec néanmoins une concentration dans la partie 3'. Cette zone correspond à une zone hydrophobe très conservée notamment avec *Neospora caninum* et à un domaine transmembranaire putatif situé entre les AA 181 et 202 permettant à la protéine GRA7 d'être sécrétée et associée à la membrane (**Fischer et coll., 1998**). Cette zone de 22 AA possède 5 sites de polymorphisme identifiés dans cette étude qui séparent tous, le groupe type III et cluster MAS de l'ensemble des autres souches. La région de GRA7 présentant des épitopes cellulaires B humains dominants se situerait entre les résidus 97 et 146 (**Jacobs et coll., 1999**). Trois sites de polymorphisme sont présents dans cette région correspondant à 1 délétion distinguant la souche RMS-2001-MAU et 2 substitutions séparant le groupe type III et cluster MAS de l'ensemble des autres souches. Dans une approche de sérotypage, des peptides spécifiques d'allèles pourraient être sélectionnés dans ces deux régions.

Actuellement, il n'existe pas de méthode sérologique permettant le sérotypage sans avoir isolé la souche responsable de l'infection. **Johnson et coll. (2003)** ont tenté de mettre au point un test de sérotypage chez l'homme et le rat à partir des nucléosides triphosphates hydrolases (antigènes recombinants ou peptides spécifiques) sans réussir à établir de corrélation entre la réactivité des peptides sélectionnés et la virulence des souches. **Kong et coll. (2003)** ont développé un test sérologique à partir de peptides synthétiques. Ils ont observé un manque de réactivité avec des peptides de SAG1 (261-275/I et 261-275/II-III). Par contre, des peptides provenant principalement d'antigènes de granules denses, notamment GRA6, permettent de discriminer les souches de type II des non II.

Les peptides spécifiques d'allèles de SAG1 sélectionnés dans cette étude ne sont pas actuellement utilisables en sérotypage. Malgré l'intérêt déjà ancien porté par notre équipe sur les aspects sérologiques et de génotypage des souches, nous ne disposons que d'un nombre limité de sérums pour lesquels les types des souches responsables de l'infection étaient connus. Seules des études multicentriques permettront de collecter un nombre suffisant de sérums représentatifs des divers génotypes. L'intérêt de nos peptides de SAG1 séparant les souches de types I des non I devra alors être réévalué. De plus, l'utilisation de peptides spécifiques d'allèles GRA7, séparant les souches de type III des autres souches, serait un bon complément à l'utilisation de ces peptides en association avec ceux décrits par **Kong et coll. (2003)**.

Conclusion

Lors de l'initiation de notre DEA puis de notre thèse, l'état des connaissances identifiait le gène de la protéine de surface SAG1 comme principal support de virulence chez *T. gondii*. Après étude du polymorphisme de ce gène, nous avons sélectionné deux peptides spécifiques d'allèles, permettant de distinguer des souches virulentes de type I (peptide 251-265/I) de souches non virulentes de type II et III (peptide 251-265/II-III), par combinaison d'un algorithme prédictif et de la localisation des sites de polymorphisme identifiés. Les objectifs de notre travail étaient d'évaluer les propriétés immunogènes et antigéniques de ces peptides spécifiques d'allèles. Il apparaît que ces peptides sont suffisamment antigéniques pour être reconnus par les anticorps spécifiques anti-*T. gondii* de sérums humains de patients ayant contracté une toxoplasmose, sans toutefois permettre un sérotypage pour tous les sérums. Ces peptides entraînent une protection partielle chez des souris immunisées et infestées avec réduction de la charge parasitaire lors de l'infestation par une souche chronique. Aucune protection n'est induite lors d'une infestation par une souche virulente. Enfin, nous avons étudié l'impact de peptides de *T. gondii* sur la maturation et la sécrétion de cytokines par les cellules dendritiques et finalement sur leur effet à initier une réponse cellulaire. A ce jour, aucune donnée de la littérature ne fait état de la capacité de peptides spécifiques d'allèles dérivés de la protéine SAG-1 de *T. gondii* à influencer l'équilibre maturation/sécrétion cytokinique des cellules dendritiques. Nous avons montré que les peptides spécifiques d'allèles pouvaient partiellement activer les cellules dendritiques immatures et induire une synthèse cytokinique et une orientation différentielle de la réponse immune. L'activation de ces cellules implique l'expression de récepteurs déclenchant une ou plusieurs voies de signalisation qu'il reste à élucider. Seul le peptide représentatif des souches de type II/III oriente l'immunité vers un profil de type Th-1, protecteur.

Nous montrons que le choix du peptide est crucial, puisqu'une modification de quelques acides aminés peut mener à une modulation de leur antigénicité et de leur immunogénicité, ouvrant la voie à l'utilisation de peptides sélectionnés pour le diagnostic mais aussi pour le

sérodiagnostic. En effet, il n'existe pas actuellement de méthodes sérologiques qui permettent de détecter le sérotype d'un sérum sans isolement de la souche responsable. C'est probablement en combinant plusieurs peptides que ce sérotypage pourra être réalisé, les gènes SAG1 et GRA7 pourraient être de bons candidats pour une utilisation en sérotypage en complément de GRA6 déjà décrit. Il conviendra de synthétiser d'autres peptides et de les tester sur un plus grand nombre de sérums représentatifs des différents types de souches (I, II, III et atypiques). Seules des études multicentriques permettront de disposer de tels échantillons.

L'utilisation de constituants immunogènes du parasite de plus en plus fins (tels que les peptides), donnera accès à une meilleure compréhension des mécanismes déclencheurs de la réponse immune et des relations entre les acteurs de l'immunité cellulaire, elle permettra en outre la mise au point de techniques de détection plus ciblées ouvrant ainsi la voie à l'établissement d'une corrélation entre le génotype de la souche et la pathogénie chez l'homme.

Bibliographie

1. ABGRALL S, RABAU D C, COSTAGLIOLA D.
Incidence and risk factors for toxoplasmic encephalitis in human immunodeficiency virus-infected patients before and during the highly active antiretroviral therapy era.
Clin Infect Dis 2001 ; 33 (10) : 1747-55.
2. ADJOGLE KD, MERCIER C, DUBREMETZ JF, HUCKE C, MACKENZIE CR, CESBRON-DELAUW MF et al.
GRA9, a new *Toxoplasma gondii* dense granule protein associated with the intravacuolar network of tubular membranes.
Int J Parasitol 2004 ; 34 (11) : 1255-64.
3. AHN HJ, KIM S, NAM HW.
Host cell binding of GRA10, a novel, constitutively secreted dense granular protein from *Toxoplasma gondii*.
Biochem Biophys Res Commun 2005 ; 331 (2) : 614-20.
4. AJZENBERG D, BANULS AL, TIBAYRENC M, DARDÉ ML.
Microsatellite analysis of *Toxoplasma gondii* shows considerable polymorphism structured into two main clonal groups.
Int J Parasitol 2002 (a) ; 32 : 27-38.
5. AJZENBERG D, COGNE N, PARIS L, BESSIERES MH, THULLIEZ P, FILISETTI D et al.
Genotype of 86 *Toxoplasma gondii* isolates associated with human congenital toxoplasmosis and correlation with clinical findings.
J Infect Dis 2002 (b) ; 186 : 684-9.
6. AJZENBERG D, BANULS AL, SU C, DUMETRE A, DEMAR M, CARME B et al.
Genetic diversity, clonality and sexuality in *Toxoplasma gondii*.
Int J Parasitol 2004 ; 34 (10) : 1185-96.
7. AJZENBERG D, DUMETRE A, DARDE ML.
Multiplex PCR for typing strains of *Toxoplasma gondii*.
J Clin Microbiol 2005 ; 43 (4) : 1940-3.
8. ALIBERTI J, SHER A.
Role of G-protein-coupled signaling in the induction and regulation of dendritic cell function by *Toxoplasma gondii*.
Microbes Infect 2002 (a) ; 4 (9) : 991-7.
9. ALIBERTI J, SHER A.
Positive and negative regulation of pathogen induced dendritic cell function by G-protein coupled receptors.
Mol Immunol 2002 (b) ; 38 (12-13) : 891-3.
10. ALIBERTI J, HIENY S, REIS E SOUSA C, SERHAN CN, SHER A.
Lipoxin-mediated inhibition of IL-12 production by DCs: a mechanism for regulation of microbial immunity.
Nat Immunol 2002 ; 3 (1) : 76-82.
11. ALIX A.
Predictive estimation of protein linear epitopes by using the program PEOPLE.
Vaccine 1999 ; 18 : 311-4.

12. AMBROISE-THOMAS P, SCHWEITZER M, PINON JM, THIEBAUGEORGES O.
Prevention of congenital toxoplasmosis in France Risk assessment Results and perspectives of prenatal screening and newborn follow up.
Bull Acad Natl Med 2001 ; 185 (4) : 665-88.
13. ANGUS CW, KLIVINGTON-EVANS D, DUBEY JP, KOVACS JA.
Immunization with a DNA plasmid encoding the SAG1 (P30) protein of *Toxoplasma gondii* is immunogenic and protective in rodents.
J Infect Dis 2000 ; 181 (1) : 317-24.
14. APPLEFORD PJ, SMITH JE.
Toxoplasma gondii: the growth characteristics of three virulent strains.
Acta Trop 1997 ; 65 (2) : 97-104.
15. ARAUJO FG.
Immunization against *Toxoplasma gondii*.
Parasitol Today 1994 ; 10 (9) : 358-60.
16. ASAI T, O'SULLIVAN WJ, TATIBANA M.
A potent nucleoside triphosphate hydrolase from the parasitic protozoan *Toxoplasma gondii*. Purification, some properties, and activation by thiol compounds.
J Biol Chem 1983 ; 258 (11) : 6816-22.
17. AUBERT D, FOU DRINIER F, VILLENA I, PINON JM, BIAVA MF, RENOULT EJ.
PCR for diagnosis and follow-up of two cases of disseminated toxoplasmosis after kidney grafting.
J Clin Microbiol 1996 ; 34 (5) : 1347.
18. AUBERT D, MAINE GT, VILLENA I, HUNT JC, HOWARD L, SHEU M et al.
Recombinant antigens to detect *Toxoplasma gondii*-specific immunoglobulin G and immunoglobulin M in human sera by enzyme immunoassay.
J Clin Microbiol 2000 ; 38 (3) : 1144-50.
19. BERMUDEZ LE, COVARO G, REMINGTON J.
Infection of murine macrophages with *Toxoplasma gondii* is associated with release of transforming growth factor beta and downregulation of expression of tumor necrosis factor receptors.
Infect Immun 1993 ; 61 (10) : 4126-30.
20. BHOPALE GM.
Pathogenesis of toxoplasmosis.
Comp Immunol Microb Infect Dis 2003 (a) ; 26 : 213-22.
21. BHOPALE GM.
Development of a vaccine for toxoplasmosis: current status.
Microb Infect 2003 (b) ; 5 : 457-62.
22. BIEMANS R, GREGOIRE D, HAUMONT M, BOSSELOIR A, GARCIA L, JACQUET A et al.
The conformation of purified *Toxoplasma gondii* SAG1 antigen, secreted from engineered *Pichia pastoris*, is adequate for serorecognition and cell proliferation.
J Biotechnol 1998 ; 66 (2-3) : 137-46.

23. BIRON CA.
Activation and function of natural killer cell responses during viral infections.
Curr Opin Immunol 1997 ; 9 (1) : 24-34.
24. BLISS SK, BUTCHER BA, DENKERS EY.
Rapid recruitment of neutrophils containing prestored IL-12 during microbial infection.
J Immunol 2000 ; 165 (8) : 4515-21.
25. BLISS SK, GAVRILESCU LC, ALCARAZ A, DENKERS EY.
Neutrophil depletion during *Toxoplasma gondii* infection leads to impaired immunity, lethal systemic pathology.
Infect Immun 2001 ; 69 (8) : 4898-905.
26. BOHNE W, HEESEMANN J, GROSS U.
Induction of bradyzoite-specific *Toxoplasma gondii* antigens in gamma interferon-treated mouse macrophages.
Infect Immun 1993 ; 61 (3) : 1141-5.
27. BONENFANT C, DIMIER-POISSON I, VELGE-ROUSSEL F, BUZONI-GATEL D, DEL GIUDICE G, RAPPUOLI R et al.
Intranasal immunization with SAG1 and nontoxic mutant heat-labile enterotoxins protects mice against *Toxoplasma gondii*.
Infect Immun 2001 ; 69 (3) : 1605-12.
28. BONHOMME A, MAINE GT, BEORCHIA A, BURLET H, AUBERT D, VILLENA I et al.
Quantitative immunolocalization of a P29 protein (GRA7), a new antigen of *Toxoplasma gondii*.
J Histochem Cytochem 1998 ; 46 (12) : 1411-22.
29. BOOTHROYD JC, HEHL A, KNOLL LJ, MANGER ID.
The surface of *Toxoplasma*: more and less.
Int J Parasitol 1998 ; 28 (1) : 3-9.
30. BOURGUIN I, MOSER M, BUZONI-GATEL D, TIELEMANS F, BOUT D, URBAIN J et al.
Murine dendritic cells pulsed in vitro with *Toxoplasma gondii* antigens induce protective immunity in vivo.
Infect Immun 1998 ; 66 (10) : 4867-74.
31. BÜLOW R, BOOTHROYD JC.
Protection of mice from fatal *Toxoplasma gondii* infection by immunization with P30 antigen in liposomes.
J Immunol 1991 ; 147 (10) : 3496-500.
32. BURG JL, PERELMAN D, KASPER LH, WARE PL, BOOTHROYD JC.
Molecular analysis of the gene encoding the major surface antigen of *Toxoplasma gondii*.
J Immunol 1988 ; 141 : 3584-91.
33. BUTCHER BA, KIM L, JOHNSON PF, DENKERS EY.
Toxoplasma gondii tachyzoites inhibit proinflammatory cytokine induction in infected macrophages by preventing nuclear translocation of the transcription factor NF-kappa B.
J Immunol 2001 ; 167 (4) : 2193-201.
34. BUXTON D, INNES EA.
A commercial vaccine for ovine toxoplasmosis.
Parasitol 1995 ; 110 : S11-6.

35. CAI G, KASTELEIN R, HUNTER CA.
Interleukin-18 (IL-18) enhances innate IL-12-mediated resistance to *Toxoplasma gondii*.
Infect Immun 2000 ; 68 (12) : 6932-8.
36. CARRUTHERS VB, SIBLEY LD.
Sequential protein secretion from three distinct organelles of *Toxoplasma gondii* accompanies invasion of human fibroblasts.
Eur J Cell Biol 1997 ; 73 (2) : 114-23.
37. CARRUTHERS VB.
Armed, dangerous: *Toxoplasma gondii* uses an arsenal of secretory proteins to infect host cells.
Parasitol Int 1999 ; 48 (1) : 1-10.
38. CARRUTHERS VB.
Host cell invasion by the opportunistic pathogen *Toxoplasma gondii*.
Acta Trop 2002 ; 81 (2) : 111-22.
39. CELLA M, SALIO M, SAKAKIBARA Y, LANGEN H, JULKUNEN I, LANZAVECCHIA A.
Maturation, activation, and protection of dendritic cells induced by double-stranded RNA.
J Exp Med 1999 ; 189 (5) : 821-9.
40. CEREDE O, DUBREMETZ JF, SOETE M, DESLEE D, VIAL H, BOUT D et al.
Synergistic role of micronemal proteins in *Toxoplasma gondii* virulence.
J Exp Med 2005 ; 201 (3) : 453-63.
41. CESBRON JY, CAPRON A, OVLAQUE G, SANTORO F.
Use of a monoclonal antibody in a double-sandwich ELISA for detection of IgM antibodies to *Toxoplasma gondii* major surface protein (P30).
J Immunol Methods 1985 ; 83 (1) : 151-8.
42. CHA DY, SONG IK, LEE GS, HWANG OS, NOH HJ, YEO SD et al.
Effects of specific monoclonal antibodies to dense granular proteins on the invasion of *Toxoplasma gondii* in vitro and in vivo.
Korean J Parasitol 2001 ; 39 (3) : 233-40.
43. CHANDENIER J, JARRY G, NASSIF D, DOUADI Y, PARIS L, THULLIEZ P et al.
Congestive heart failure and myocarditis after seroconversion for toxoplasmosis in two immunocompetent patients.
Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2000 ; 19 (5) : 375-9.
44. CHAVES AC, CERAVOLO IP, GOMES JA, ZANI CL, ROMANHA AJ, GAZZINELLI RT.
IL-4 and IL-13 regulate the induction of indoleamine 2,3-dioxygenase activity and the control of *Toxoplasma gondii* replication in human fibroblasts activated with IFN-gamma.
Eur J Immunol 2001 ; 31 (2) : 333-44.
45. CHEN XG, FUNG MC, MA X, PENG HJ, SHEN SM, LIU GZ.
Baculovirus expression of the major surface antigen of *Toxoplasma gondii* and the immune response of mice injected with the recombinant P30.
Southeast Asian J Trop Med Public Health 1999 ; 30 (1) : 42-6.
46. CHEN G, CHEN H, GUO H, ZHENG H.
Protective effect of DNA-mediated immunization with a combination of SAG1 and IL-2 gene adjuvant against infection of *Toxoplasma gondii* in mice.
Chin Med J 2002 ; 115 (10) : 1448-52.

47. CORINTI S, ALBANESI C, LA SALA A, PASTORE S, GIROLOMONI G.
Regulatory activity of autocrine IL-10 on dendritic cell functions.
J Immunol 2001 ; 166 (7) : 4312-8.
48. COUPER KN, NIELSEN HV, PETERSEN E, ROBERTS F, ROBERTS CW, ALEXANDER J.
DNA vaccination with the immunodominant tachyzoite surface antigen (SAG-1) protects against adult acquired *Toxoplasma gondii* infection but does not prevent maternofetal transmission.
Vaccine 2003 ; 21 (21-22) : 2813-20.
49. DA GAMA LM, RIBEIRO-GOMES FL, GUIMARAES U JR, ARNHOLDT AC.
Reduction in adhesiveness to extracellular matrix components, modulation of adhesion molecules and *in vivo* migration of murine macrophages infected with *Toxoplasma gondii*.
Microbes Infect 2004 ; 6 (14) : 1287-96.
50. DARCY F, MAES P, GRAS-MASSE H, AURIAULT C, BOSSUS M, DESLEE D et al.
Protection of mice and nude rats against toxoplasmosis by a multiple antigenic peptide construction derived from *Toxoplasma gondii* P30 antigen.
J Immunol 1992 ; 149 (11) : 3636-41.
51. DARDE ML, BOUTEILLE B, PESTRE-ALEXANDRE M.
Isoenzyme analysis of 35 *Toxoplasma gondii* isolates and the biological and epidemiological implications.
J Parasitol 1992 ; 78 (5) : 786-94.
52. DARDE ML.
Biodiversity in *Toxoplasma gondii*.
Curr Top Microbiol Immunol 1996 ; 219 : 27-41.
53. DARDE ML, VILLENA I, PINON JM , BEGUINOT I.
Severe toxoplasmosis caused by a *Toxoplasma gondii* strain with the new Isoenzyme type acquired in French Guyana.
J Clin Microbiol 1998 ; 36 : 324.
54. DARDE ML.
Genetic analysis of the diversity in *Toxoplasma gondii*.
Ann Ist Super Sanita 2004 ; 40 (1) : 57-63.
55. DEBARD N, BUZONI-GATEL D, BOUT D.
Intranasal immunization with SAG1 protein of *Toxoplasma gondii* in association with cholera toxin dramatically reduces development of cerebral cysts after oral infection.
Infect Immun 1996 ; 64 (6) : 2158-66.
56. DEL RIO L, BENNOUNA S, SALINAS J, DENKERS EY.
CXCR2 deficiency confers impaired neutrophil recruitment and increased susceptibility during *Toxoplasma gondii* infection.
J Immunol 2001 ; 167 (11) : 6503-9.
57. DENKERS EY, GAZZINELLI R.
Regulation and function of T-cell mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection.
Clin Microb Rev 1998 ; 11 (4) : 569-88.
58. DENKERS EY.
From cells to signaling cascades: manipulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii*.
FEMS 2003 ; 1633 : 1-11.

59. DENKERS EY, DEL RIO L, BENNOUNA S.
Neutrophil production of IL-12 and other cytokines during microbial infection.
Chem Immunol Allergy 2003 ; 83 : 95-114.
60. DENKERS EY, BUTCHER BA.
Sabotage and exploitation in macrophages parasitized by intracellular protozoans.
Trends Parasitol 2005 ; 21 (1) : 35-41.
61. DIANA J, PERSAT F, STAQUET MJ, ASSOSSOU O, FERRANDIZ J, GARIAZZO MJ et al.
Migration and maturation of human dendritic cells infected with *Toxoplasma gondii* depend on parasite strain type.
FEMS Immunol Med Microbiol 2004 ; 42 (3) : 321-331.
62. DIMIER-POISSON I, ALINE F, MEVELEC MN, BEAUVILLAIN C, BUZONI-GATEL D, BOUT D.
Protective mucosal Th-2 immune response against *Toxoplasma gondii* by murine mesenteric lymph node dendritic cells.
Infect Immun 2003 ; 7 (9) : 5254-65.
63. DINARELLO CA.
IL-18: A TH1-inducing, proinflammatory cytokine and new member of the IL-1 family.
J Allergy Clin Immunol 1999 ; 103 (1 Pt 1) : 11-24.
64. DUBEY JP, LINDSAY DS, SPEER CA.
Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts.
Clin Microbiol Rev 1998 ; 11 (2) : 267-99.
65. DUBEY JP.
Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*.
Int J Parasitol 1998 ; 28 : 1019-24.
66. FACHADO A, RODRIGUEZ A, ANGEL SO, PINTO DC, VILA I, ACOSTA A et al.
Protective effect of a naked DNA vaccine cocktail against lethal toxoplasmosis in mice.
Vaccine 2003 ; 21 (13-14) : 1327-35.
67. FANG Y, TAN Y, ZHANG Y, LI J.
Effect of IL-6 on the multiplication of *Toxoplasma gondii*.
Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi 1999 ; 17 (2) : 106-8.
68. FATOOHI AF, COZON GJ, GREENLAND T, FERRANDIZ J, BIENVENU J, PICOT S et al.
Cellular immune responses to recombinant antigens in pregnant women chronically infected with *Toxoplasma gondii*.
Clin Diagn Lab Immunol 2002 ; 9 (3) : 704-7.
69. FERGUSON DJ, HUTCHISON WM.
Comparison of the development of avirulent and virulent strains of *Toxoplasma gondii* in the peritoneal exsudate of mice .
Ann Trop Med Parasitol 1981 ; 75 : 539-46.
70. FERGUSON DJ.
Use of molecular and ultrastructural markers to evaluate stage conversion of *Toxoplasma gondii* in both the intermediate and definitive host.
Int J Parasitol 2004 ; 34 (3) : 347-60.

71. FILISETTI D, CANDOLFI E.
Immune response to *Toxoplasma gondii*.
Ann Ist Super Sanita 2004 ; 40 (1) : 71-80.
72. FISCHER HG, STACHELHAUS S, SAHM M, MEYER HE, REICHMANN G.
GRA7, an excretory 29 kDa *Toxoplasma gondii* dense granule antigen released by infected host cells.
Mol Biochem Parasitol 1998 ; 91 (2) : 251-62.
73. FISCHER HG, BONIFAS U, REICHMANN G.
Phenotype and functions of brain dendritic cell emerging during chronic infection of mice with *Toxoplasma gondii*.
J Immunol 2000 ; 164 (9) : 4826-34.
74. FUENTES I, RUBIO J, RAMIREZ C, ALVAR J.
Genotypic characterization of *Toxoplasma gondii* strains associated with human toxoplasmosis in Spain: direct analysis from clinical samples.
J Clin Microbiol 2001 ; 39 : 1566-70.
75. FUX B, RODRIGUES CV, PORTELA RW, SILVA NM, SU C, SIBLEY D et al.
Role of cytokines and major histocompatibility complex restriction in mouse resistance to infection with a natural recombinant strain (type I-III) of *Toxoplasma gondii*.
Infect Immun 2003 ; 71 (11) : 6392-401.
76. GAVRILESCU LC, DENKERS EY.
IFN- γ overproduction and high level apoptosis are associated with high but not low virulence *Toxoplasma gondii* infection.
J Immunol 2001 ; 167 (2) : 902-9.
77. GAZZINELLI R, HIENY S, WYNN T, WOLF S, SHER A.
Interleukin-12 is required for the T-lymphocyte-independent induction of Interferon- γ by an intracellular parasite and induces resistance in T-cell-deficient hosts.
Proc Natl Acad Sci USA 1993 ; 90 : 6115-19.
78. GAZZINELLI RT, WYSOCKA M, HAYASHI S, DENKERS EY, HIENY S, CASPAR P et al.
Parasite-induced IL-12 stimulates early IFN- γ synthesis and resistance during acute infection with *Toxoplasma gondii*.
J Immunol 1994 ; 153 (6) : 2533-43.
79. GIESE A, STUHLSTATZ S, DAUBENER W, MACKENZIE CR.
Inhibition of the growth of *Toxoplasma gondii* in immature human dendritic cells is dependent on the expression of TNF- α receptor 2.
J Immunol. 2004 ; 173 (5) : 3366-74.
80. GODARD I, ESTAQUIER J, ZENNER L, BOSSUS M, AURIAULT C, DARCY F et al.
Antigenicity and immunogenicity of P30-derived peptides in experimental models of toxoplasmosis.
Mol Immunol 1994 ; 31 (17) : 1353-1363.
81. GOEBEL S, GROSS U, LUDER CG.
Inhibition of host cell apoptosis by *Toxoplasma gondii* is accompanied by reduced activation of the caspase cascade and alterations of poly (ADP-ribose) polymerase expression.
J Cell Sci 2001 ; 114 (Pt 19) : 3495-505.

82. GRIGG ME, BONNEFOY S, HEHL AB, SUZUKI Y, BOOTHROYD JC.
Success and virulence in *Toxoplasma* as the result of sexual recombination between two distinct ancestries.
Science 2001 (a) ; 294 (5540) :161-5.
83. GRIGG ME, GANATRA J, BOOTHROYD JC, MARGOLIS TP.
Unusual abundance of atypical strains associated with human ocular toxoplasmosis.
J Infect Dis 2001 (b) ; 184 (5) : 633-9.
84. GRIMWOOD J, SMITH JE.
Toxoplasma gondii: the role of a 30-kDa surface protein in host cell invasion.
Exp Parasitol 1992 ; 74 (1) : 106-11.
85. GRIMWOOD J, SMITH JE.
Toxoplasma gondii: the role of parasite surface and secreted proteins in host cell invasion.
Int J Parasitol 1996 ; 26 (2) : 169-73.
86. GROUX H, BIGLER M, DE VRIES JE, RONCAROLO MG.
Inhibitory and stimulatory effects of IL-10 on human CD8+ T cells.
J Immunol 1998 ; 160 (7) : 3188-93.
87. GRUNVALD E, CHARAMONTE M, HIENY S, WYSOCKA M, TRINCHIERI G, VOGEL SN et al.
Biochemical characterization and protein kinase C dependency of monokine-inducing activities of *Toxoplasma gondii*.
Infect Immun 1996 ; 64 (6) : 2010-8.
88. HALONEN SK, CHIU F, WEISS LM.
Effect of cytokines on growth of *Toxoplasma gondii* in murine astrocytes.
Infect Immun 1998 ; 66 (10) : 4989-93.
89. HAUMONT M, DELHAYE L, GARCIA L, JURADO M, MAZZU P, DAMINET V et al.
Protective immunity against congenital toxoplasmosis with recombinant SAG1 protein in a guinea pig model.
Infect Immun 2000 ; 68 (9) : 4948-53.
90. HE XL, GRIGG M, BOOTHROYD J, GARCIA C.
Structure of the immunodominant surface antigen from the *Toxoplasma gondii* SRS superfamily.
Nat Struct Biol 2002 ; 9 (8) : 606-11.
91. HILKENS CM, KALINSKI P, DE BOER M, KAPSENBERG ML.
Human dendritic cells require exogenous interleukin-12-inducing factors to direct the development of naive T-helper cells toward the Th1 phenotype.
Blood 1997 ; 90 (5) : 1920-6.
92. HOWE DK, SIBLEY LD.
Toxoplasma gondii comprises three clonal lineages : correlation of parasite genotype with human disease.
J Infect Dis 1995 ; 172 : 1561-6.
93. HOWE DK, SUMMERS BC, SIBLEY DL.
Acute virulence in mice is associated with markers on chromosome VIII in *Toxoplasma gondii*.
Infect Immun 1996 ; 64 : 5193-8.

94. HOWE DK, HONORE S, DEROUIN F, SIBLEY LD.
Determination of *Toxoplasma gondii* strains isolated from patients with toxoplasmosis.
J Clin Microbiol 1997 ; 35 (6) : 1411-4.
95. HUNTER CA, SUBAUSTE CS, VAN CLEAVE VH, REMINGTON JS.
Production of gamma- Interferon by natural killer cells from *Toxoplasma gondii*-infected SCID mice: regulation by Interleukin-10, Interleukin-12, and Tumor Necrosis Factor-alpha.
Infect Immun 1994 ; 62 (7) : 2818-24.
96. HUNTER CA, REMINGTON JS.
The role of IL-12 in toxoplasmosis.
Res Immunol 1995 ; 146 (7-8) : 546-52.
97. HUNTER CA, BERMUDEZ L, BEERNINK H, WAEGELL W, REMINGTON JS.
Transforming growth factor-beta inhibits interleukin-12-induced production of interferon-gamma by natural killer cells: a role for transforming growth factor-beta in the regulation of T cell-independent resistance to *Toxoplasma gondii*.
Eur J Immunol 1995 ; 25 (4) : 994-1000.
98. HUNTER CA, CHIZZONITE R, REMINGTON JS.
IL-1 beta is required for IL-12 to induce production of IFN-gamma by NK cells. A role for IL-1 beta in the T cell-independent mechanism of resistance against intracellular pathogens.
J Immunol 1995 (b) ; 155 (9) : 4347-54.
99. ISMAEL AB, SEKKAI D, COLLIN C, BOUT D, MEVELEC MN.
The MIC3 gene of *Toxoplasma gondii* is a novel potent vaccine candidate against toxoplasmosis.
Infect Immun 2003 ; 71 (11) : 6222-8.
100. JACOBS L, REMINGTON JS, MELTON ML.
The resistance of the encysted form of *Toxoplasma gondii*.
J Parasitol 1960 ; 46 : 11-21.
101. JACOBS D, DUBREMETZ JF, LOYENS A, BOSMAN F, SAMAN E.
Identification and heterologous expression of a new dense granule protein (GRA7) from *Toxoplasma gondii*.
Mol Biochem Parasitol 1998 ; 91 (2) : 237-49.
102. JACOBS D, VERCAMMEN M, SAMAN E.
Evaluation of recombinant dense granule antigen 7 (GRA7) of *Toxoplasma gondii* for detection of immunoglobulin G antibodies and analysis of a major antigenic domain.
Clin Diagn Lab Immunol 1999 ; 6 (1) : 24-9.
103. JANKOVIC D, LIU Z, GAUSE WC.
Th-1 and Th-2-cell commitment during infectious disease: asymmetry in divergent pathways.
Trends Immunol 2001 ; 22 (8) : 450-7.
104. JANKOVIC D, KULLBERG MC, CASPAR P, SHER A.
Parasite-induced Th-2 polarization is associated with down-regulated dendritic cell responsiveness to Th-1 stimuli and a transient delay in T lymphocyte cycling.
J Immunol 2004 ; 173 (4) : 2419-27.
105. JENKINS MC.
Advances and prospects for subunit vaccines against protozoa of veterinary importance.
Vet Parasitol 2001 ; 101 (3-4) : 291-310.

106. JOHNSON L.
A protective role for endogenous Tumor Necrosis Factor in *Toxoplasma gondii*.
Infect Immun 1992 ; 60 : 1979-83.
107. JOHNSON M, BROADY K, ANGELICI MC, JOHNSON A.
The relationship between nucleoside triphosphate hydrolase (NTPase) isoform and *Toxoplasma* strain virulence in rat and human toxoplasmosis.
Microbes Infect 2003 ; 5 (9) : 797-806.
108. JUNG C, LEE CY, GRIGG ME.
The SRS superfamily of *Toxoplasma* surface proteins.
Int J Parasitol 2004 ; 34 (3) : 285-96.
109. KALINSKI P, SCHUITEMAKER JH, HILKENS CM, KAPSENBERG ML.
Prostaglandin E2 induces the final maturation of IL-12-deficient CD1a+CD83+ dendritic cells: the levels of IL-12 are determined during the final dendritic cell maturation and are resistant to further modulation.
J Immunol 1998 ; 161 (6) : 2804-9.
110. KALINSKI P, HILKENS CM, WIERENGA EA, KAPSENBERG ML.
T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal.
Immunol Today 1999 ; 20 (12) : 561-7.
111. KASPER LH, WARE PL.
Recognition and characterization of stage-specific oocyst/sporozoite antigens of *Toxoplasma gondii* by human antisera.
J Clin Invest 1985 ; 75 (5) : 1570-7.
112. KASPER LH, KHAN IA.
Role of P30 in host immunity and pathogenesis of *T gondii* infection.
Res Immunol 1993 ; 144 (1) : 45-8.
113. KASPER L, COURRET N, DARCHE S, LUANGSAY S, MENNECHET F, MINNS L et al.
Toxoplasma gondii and mucosal immunity.
Int J Parasitol 2004 ; 34 (3) : 401-9.
114. KAUFMAN HE, MALONEY ED.
Multiplication of three strains of *Toxoplasma gondii* in tissue culture.
J Parasitol 1962 ; 48 : 358-61.
115. KELLY MN, KOLLS JK, HAPPEL K, SCHWARTZMAN JD, SCHWARZENBERGER P, COMBE C et al.
Interleukin-17/interleukin-17 receptor-mediated signaling is important for generation of an optimal polymorphonuclear response against *Toxoplasma gondii* infection.
Infect Immun 2005 ; 73 (1) : 617-21.
116. KHAN IA, ECKEL ME, PFEFFERKORN ER, KASPER LH.
Production of gamma-Interferon by cultured human lymphocytes stimulated with a purified membrane protein (P30) from *Toxoplasma gondii*.
J Infect Dis 1988 ; 157 (5) : 979-84.
117. KHAN IA, ELY KH, KASPER LH.
A purified parasite antigen (P30) mediates CD8+ T cell immunity against fatal *Toxoplasma gondii* infection in mice.
J Immunol 1991 ; 147 (10) : 3501-6.

118. KHAN IA, ELY KH, KASPER LH.
Antigen-specific CD8+ T cell clone protects against acute *Toxoplasma gondii* infection in mice.
J Immunol 1994 ; 152 (4) : 1856-60.
119. KHAN IA, KASPER LH.
IL-15 augments CD8+ T cell-mediated immunity against *Toxoplasma gondii* infection in mice.
J Immunol 1996 ; 157 (5) : 2103-8.
120. KHAN IA, MATSUURA T, KASPER LH.
Activation-mediated CD4+ T cell unresponsiveness during acute *Toxoplasma gondii* infection in mice.
Int Immunol 1996 ; 8 (6) : 887-96.
121. KHAN IA, CASCIOTTI L.
IL-15 prolongs the duration of CD8+ T cell-mediated immunity in mice infected with a vaccine strain of *Toxoplasma gondii*.
J Immunol 1999 ; 163 8 : 4503-9.
122. KIM K, BULOW R, KAMPMEIER J, BOOTHROYD JC.
Conformationally appropriate expression of the *Toxoplasma* antigen SAG1 (P30) in CHO cells.
Infect Immun 1994 ; 62 (1) : 203-9.
123. KONG JT, GRIGG ME, UYETAKE L, PARMLEY S, BOOTHROYD JC.
Serotyping of *Toxoplasma gondii* infections in humans using synthetic peptides.
J Infect Dis 2003 ; 187 (9) : 1484-95.
124. LANGERMANS JA, NIBBERING PH, VAN VUREN-VAN DER HULST ME, VAN FURTH R.
Transforming growth factor-beta suppresses interferon-gamma-induced toxoplasma static activity in murine macrophages by inhibition of tumour necrosis factor-alpha production.
Parasite Immunol 2001 ; 23 (4) : 169-75.
125. LEHMANN T, BLACKSTON CR, PARMLEY SF, REMINGTON JS, DUBEY JP.
Strain typing of *Toxoplasma gondii*: comparison of antigen-coding and housekeeping genes.
J Parasitol 2000 ; 86 (5) : 960-71.
126. LETSCHER-BRU V, VILLARD O, RISSE B, ZAUKE M, KLEIN JP, KIEN TT.
Protective effect of vaccination with a combination of recombinant surface antigen 1 and Interleukin-12 against toxoplasmosis in mice.
Infect Immun 1998 ; 66 (9) : 4503-6.
127. LETSCHER-BRU V, PFAFF AW, ABOU-BACAR A, FILISETTI D, ANTONI E, VILLARD O et al.
Vaccination with *Toxoplasma gondii* SAG-1 protein is protective against congenital toxoplasmosis in BALB/c mice but not in CBA/J mice.
Infect Immun 2003 ; 71 (11) : 6615-9.
128. LEYVA R, HERION P, SAAVEDRA R.
Genetic immunization with plasmid DNA coding for the ROP2 protein of *Toxoplasma gondii*.
Parasitol Res 2001 ; 87 (1) : 70-9.

129. LIEBERMAN LA, HUNTER CA.
The role of cytokines and their signaling pathways in the regulation of immunity to *Toxoplasma gondii*.
Int Rev Immunol 2002 ; 21 (4-5) : 373-403.
130. LIEBERMAN LA, CARDILLO F, OWYANG AM, RENNICK DM, CUA DJ, KASTELEIN RA et al.
IL-23 provides a limited mechanism of resistance to acute toxoplasmosis in the absence of IL-12.
J Immunol 2004 (a) ; 173 (3) : 1887-93.
131. LIEBERMAN LA, VILLEGAS EN, HUNTER CA.
Interleukin-15-deficient mice develop protective immunity to *Toxoplasma gondii*.
Infect Immun 2004 (b) ; 72 (11) : 6729-32.
132. LIN MH, CHEN TC, KUO TT, TSENG CC, TSENG CP.
Real-time PCR for quantitative detection of *Toxoplasma gondii*.
J Clin Microbiol 2000 ; 38 (11) : 4121-5.
133. LOCKSLEY RM.
Interleukin-12 in host defense against microbial pathogens.
Proc Natl Acad Sci 1993 ; 90 (13) : 5879-80.
134. LOPEZ M, FECHTENBAUM J, DAVID B, MARTINACHE C, CHOKRI M, CANEPA S et al.
Adoptive immunotherapy with activated macrophages grown in vitro from blood monocytes in cancer patients: a pilot study.
J Immunother 1992 ; 11 : 209-17.
135. LU F, HUANG S, KASPER LH.
Interleukin-10 and pathogenesis of murine ocular toxoplasmosis.
Infect Immun 2003 ; 71 (12) : 7159-63.
136. LUDER CG, SEEBER F.
Toxoplasma gondii and MHC-restricted antigen presentation: on degradation, transport and modulation.
Int J Parasitol 2001 ; 31 (12) : 1355-69.
137. LUDER CG, GROSS U.
Apoptosis and its modulation during infection with *Toxoplasma gondii*: molecular mechanisms and role in pathogenesis.
Curr Top Microbiol Immunol 2005 ; 289 : 219-37.
138. LUNDEN A, LOVGREN K, UGGLA A, ARAUJO FG.
Immune responses and resistance to *Toxoplasma gondii* in mice immunized with antigens of the parasite incorporated into immunostimulating complexes.
Infect Immun 1993 ; 61 (6) : 2639-43.
139. LUTZ MB, SCHULER G.
Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity?
Trends Immunol 2002 ; 23 (9) : 445-9.

140. LYONS RE, ANTHONY JP, FERGUSON DJ, BYRNE N, ALEXANDER J, ROBERTS F et al.
Immunological studies of chronic ocular toxoplasmosis: up-regulation of major histocompatibility complex class I and transforming growth factor beta and a protective role for interleukin-6.
Infect Immun, 2001 ; 69 (4) : 2589-95.
141. MACKAY CR
Chemokines: immunology's high impact factors.
Nat Immunol 2001 ; (2) 2 : 95-101.
142. MAKIOKA A, KOBAYASHI A.
Toxoplasma-cidal activity of macrophages activated by recombinant major surface antigen (P30) of *Toxoplasma gondii*.
Infect Immun 1991 ; 59 (8) : 2851-2.
143. MANGER ID, HEHL AB, BOOTHROYD JC.
The surface of *Toxoplasma* tachyzoites is dominated by a family of glycosylphosphatidylinositol-anchored antigens related to SAG1.
Infect Immun 1998 ; 66 (5) : 2237-44.
144. MARTIN V, SUPANITSKY A, ECHEVERRIA PC, LITWIN S, TANOS T, DE ROODT AR et al.
Recombinant GRA4 or ROP2 protein combined with alum or the *gra4* gene provides partial protection in chronic murine models of toxoplasmosis.
Clin Diagn Lab Immunol 2004 ; 11 (4) :704-10.
145. McKEE AS, DZIERSZINSKI F, BOES M, ROOS DS, PEARCE EJ.
Functional inactivation of immature dendritic cells by the intracellular parasite *Toxoplasma gondii*.
J Immunol 2004 ; 173 (4) : 2632-40.
146. MERCIER C, DUBREMETZ JF, RAUSCHER B, LECORDIER L, SIBLEY LD, CESBRON-DELAUW MF.
Biogenesis of nanotubular network in *Toxoplasma* parasitophorous vacuole induced by parasite proteins.
Mol Biol Cell 2002 ; 13 (7) : 2397-409.
147. MERCIER C, ADJOGLE KD, DAUBENER W, DELAUW MF.
Dense granules: Are they key organelles to help understand the parasitophorous vacuole of all apicomplexa parasites?
Int J Parasitol 2005 ; 35 (8) : 829-49
148. MILLER CM, SMITH NC, JOHNSON AM.
Parasitoid Cytokines, nitric oxide, heat shock proteins and virulence in *Toxoplasma*.
Parasitol Today 1999 ; 10 : 418-22.
149. MILLER MA, GRIGG ME, KREUDER C, JAMES ER, MELLI AC, CROSBIE PR et al.
An unusual genotype of *Toxoplasma gondii* is common in California sea otters (*Enhydra lutris nereis*) and is a cause of mortality.
Int J Parasitol 2004 ; 34 (3) : 275-84.

150. MINEO JR, MCLEOD R, MACK D, SMITH J, KHAN IA, ELY KH et al.
Antibodies to *Toxoplasma gondii* major surface protein (SAG-1, P30) inhibit infection of host cells and are produced in murine intestine after peroral infection.
J Immunol 1993 ; 150 (9) : 3951-64.
151. MINEO JR, KASPER LH.
Attachment of *Toxoplasma gondii* to host cells involves major surface protein, SAG-1 (P30).
Exp Parasitol 1994 (a) ; 79 (1) : 11-20.
152. MINEO JR, KHAN IA, KASPER LH.
Toxoplasma gondii: a monoclonal antibody that inhibits intracellular replication.
Exp Parasitol 1994 (b) ; 79 (3) : 351-61.
153. MONTOYA JG, LIESENFELD O.
Toxoplasmosis.
The Lancet 2004 ; 363 : 1965-76.
154. MOORE P, CAO Y, CONLEY AJ, WYATT R, ROBINSON J, GORNY M et al.
Studies with monoclonal antibodies to the V3 region of HIV-1 gp120 reveal limitations to the utility of solid phase peptide binding assays.
J Acqui Immun Defic Syndr 1993 ; 7 : 332-9.
155. MORDUE DG, DESAI N, DUSTIN M, SIBLEY LD.
Invasion by *Toxoplasma gondii* establishes a moving junction that selectively excludes host cell plasma membrane proteins on the basis of their membrane anchoring.
J Exp Med 1999 ; 190 (12) : 1783-92.
156. MORDUE D, MONROY F, LA REGINA M, DINARELLO C, SIBLEY D.
Acute Toxoplasmosis leads to lethal overproduction of Th1 cytokines.
J Immunol 2001 ; 167 : 4574-84.
157. MORRIS MT, COPPIN A, TOMAVO S, CARRUTHERS VB.
Functional analysis of *Toxoplasma gondii* protease inhibitor 1.
J Biol Chem 2002 ; 277 (47) : 45259-66.
158. MOSMANN TR, SAD S.
The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more.
Immunol Today 1996 ; 17 (3) : 138-46.
159. NAGINENI CN, DETRICK B, HOOKS JJ.
Transforming growth factor-beta expression in human retinal pigment epithelial cells is enhanced by *Toxoplasma gondii*: a possible role in the immunopathogenesis of retinochoroiditis.
Clin Exp Immunol 2002 ; 128 (2) : 372-8.
160. NASH PB, PURNER MB, LEON RP, CLARKE P, DUKE RC, CURIEL TJ.
Toxoplasma gondii-infected cells are resistant to multiple inducers of apoptosis.
J Immunol 1998 ; 160 (4) : 1824-30.
161. NEUDECK A, STACHELHAUS S, NISCHIK N, STRIEPEN B, REICHMANN G, FISCHER HG.
Expression variance, biochemical and immunological properties of *Toxoplasma gondii* dense granule protein GRA7.
Microbes Infect 2002 ; 4 (6) : 581-90.

162. NEYER LE, GRUNIG G, FORT M, REMINGTON JS, RENNICK D, HUNTER CA.
Role of interleukin-10 in regulation of T-cell-dependent and T-cell-independent mechanisms of resistance to *Toxoplasma gondii*.
Infect Immun 1997 ; 65 (5) : 1675-82.
163. NICKDEL MB, ROBERTS F, BROMBACHER F, ALEXANDER J, ROBERTS CW.
Counter-protective role for interleukin-5 during acute *Toxoplasma gondii* infection.
Infect Immun 2001 ; 69 (2) : 1044-52.
164. NIELSEN HV, LAUEMOLLER SL, CHRISTIANSEN L, BUUS S, FOMSGAARD A, PETERSEN E.
Complete protection against lethal *Toxoplasma gondii* infection in mice immunized with a plasmid encoding the SAG1 gene.
Infect Immun 1999 ; 67 (12) : 6358-63.
165. NISCHIK N, SCHADE B, DYTNEKSKA K, DLUGONSKA H, REICHMANN G, FISCHER HG.
Attenuation of mouse-virulent *Toxoplasma gondii* parasites is associated with a decrease in interleukin-12-inducing tachyzoite activity and reduced expression of actin, catalase and excretory proteins.
Microbes Infect 2001 ; 3 (9) :689-99.
166. O'GARRA A.
Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets.
Immunity 1998 ; 8 (3) : 275-83.
167. OPPMANN B, LESLEY R, BLOM B, TIMANS JC, XU Y, HUNTE B et al.
Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12.
Immunity 2000 ; 13 (5) : 715-25.
168. PANINA-BORDIGNON P, MAZZEO D, LUCIA PD, D'AMBROSIO D, LANG R, FABBRI L et al.
Beta2-agonists prevent Th1 development by selective inhibition of interleukin 12.
J Clin Invest 1997 ; 100 (6) : 1513-9.
169. PARHAM C, CHIRICA M, TIMANS J, VAISBERG E, TRAVIS M, CHEUNG J et al.
A receptor for the heterodimeric cytokine IL-23 is composed of IL-12Rbeta1 and a novel cytokine receptor subunit, IL-23R.
J Immunol 2002 ; 168 (11) : 5699-708.
170. PETERSEN E, NIELSEN HV, CHRISTIANSEN L, SPENTER J.
Immunization with E coli produced recombinant *T.gondii* SAG1 with alum as adjuvant protect mice against lethal infection with *Toxoplasma gondii*.
Vaccine 1998 ; 16 (13) : 1283-9.
171. PETERSEN E, POLLAK A, REITER-OWONA I.
Recent trends in research on congenital toxoplasmosis.
Int J Parasitol 2001 ; 31 (2) : 115-44.
172. PIETKIEWICZ H, HISZCZYNSKA-SAWICKA E, KUR J, PETERSEN E, NIELSEN HV, STANKIEWICZ M et al.
Usefulness of *Toxoplasma gondii*-specific recombinant antigens in serodiagnosis of human toxoplasmosis.
J Clin Microbiol 2004 ; 42 (4) : 1779-81.

173. PINON JM, POIRRIEZ J, LEROUX B, THOANNES H, DUPUY D, GARI M et al.
Diagnostic précoce, surveillance et bilan thérapeutique de la toxoplasmose congénitale
Indications des profils immunologiques comparés ELIFA.
Rev Intern Pediat 1986 ; 157 : 11-6.
174. PRIGIONE I, FACCHETTI P, LECORDIER L, DESLEE D, CHIESA S, CESBRON-DELAUW MF et al.
T cell clones raised from chronically infected healthy humans by stimulation with *Toxoplasma gondii* excretory-secretory antigens cross-react with live tachyzoites: characterization of the fine antigenic specificity of the clones and implications for vaccine development.
J Immunol 2000 ; 164 (7) : 3741-8.
175. PSZENNY V, LEDESMA BE, MATRAJT M, DUSCHAK VG, BONTEMPI EJ, DUBREMETZ JF et al.
Subcellular localization and post-secretory targeting of TgPI, a serine proteinase inhibitor from *Toxoplasma gondii*.
Mol Biochem Parasitol 2002 ; 121 (2) : 283-6.
176. RACHINEL N, BUZONI-GATEL D, DUTTA C, MENNECHET FJ, LUANGSAY S, MINNS LA et al.
The induction of acute ileitis by a single microbial antigen of *Toxoplasma gondii*.
J Immunol 2004 ; 173 (4) : 2725-35.
177. REIS E SOUSA C, HIENY S, SCHARTON-KERSTEN T, JANKOVIC D, CHAREST H, GERMAIN RN et al.
In vivo microbial stimulation induces rapid CD40 ligand-independent production of Interleukin-12 by dendritic cells and their redistribution to T cell areas.
J Exp Med 1997 ; 186 (11) : 1819-29.
178. RINDER H, THOMSCHKE A, DARDÉ ML, LÖSCHER T.
Specific DNA polymorphisms discriminate between virulence and non-virulence to mice in nine *Toxoplasma gondii* strains.
Mol Biochem Parasitol 1995 ; 69 : 123-6.
179. ROBERTS CW, FERGUSON DJ, JEBBARI H, SATOSKAR A, BLUETHMANN H, ALEXANDER J.
Different roles for interleukin-4 during the course of *Toxoplasma gondii* infection.
Infect Immun 1996 ; 64 (3) : 897-904.
180. RODRIGUEZ C, AFCHAIN D, CAPRON A, DISSOUS C, SANTORO F.
Major surface protein of *Toxoplasma gondii* (P30) contains an immunodominant region with repetitive epitopes.
Eur J Immunol 1985 ; (7) : 747-9.
181. SACKS D, SHER A.
Evasion of innate immunity by parasitic protozoa.
Nat Immunol 2002 ; 3 (11) : 1041-7.
182. SALLUSTO F, CELLA M, DANIELI C, LANZAVECCHIA A.
Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products.
J Exp Med 1995 ; 182 (2) : 389-400.

183. SANTORO F, AFCHAIN D, PIERCE R, CESBRON JY, OVLAQUE G, CAPRON A.
Serodiagnosis of *Toxoplasma* infection using a purified parasite protein (P30).
Clin Exp Immunol 1985 ; 62 (2) : 262-9.
184. SAYLES P, GIBSON G, JOHNSON L.
B cells are essential for vaccination induced resistance to virulent *Toxoplasma gondii*.
Infect Immunol 2000 ; 68 : 1026-33.
185. SCANGA CA, ALIBERTI J, JANKOVIC D, TILLOY F, BENNOUNA S, DENKERS EY et al.
Cutting edge: MyD88 is required for resistance to *Toxoplasma gondii* infection and regulates parasite-induced IL-12 production by dendritic cells.
J Immunol 2002 ; 168 (12) : 5997-6001.
186. SCHADE B, FISCHER HG.
Toxoplasma gondii induction of Interleukin-12 is associated with acute virulence in mice and depends on the host genotype.
Vet Parasitol 2001 ; 100 : 63-74.
187. SCOTT P, HUNTER C.
Dendritic cells and immunity to leishmaniasis and toxoplasmosis.
Immun to Infect 2002 ; 14 : 466-70.
188. SENG S, MAKALA LH, MAKI Y, CHOI YH, YOKOYAMA M, SUZUKI N et al.
Unresponsiveness to Surface Antigen 1 modifies cytokine profile in acute *Toxoplasma gondii*.
Infect Pathobiol 2002-2003 ; 70 (4) : 237-46.
189. SENG S, MAKALA LH, YOKOYAMA M, LIM C, CHOI YH, SUZUKI N et al.
SAG1 is a host-targeted antigen for protection against *Toxoplasma gondii*.
Pathobiol 2004 ; 71 (3) : 144-51.
190. SHER A, OSWALD IP, HIENY S, GAZZINELLI RT.
Toxoplasma gondii induces a T-independent IFN-gamma response in natural killer cells that requires both adherent accessory cells and Tumor Necrosis Factor-alpha.
J Immunol 1993 ; 150 (9) : 3982-9.
191. SHER A, REIS E SOUSA C.
Ignition of the type 1 response to intracellular infection by dendritic cell derived interleukin-12.
Eur Cytok Netw 1998 ; 9 (3) : 65-8.
192. SHIN EH, KIM SB, NAM HW, HAN ET, PARK JH, AHN HJ et al.
Use of monoclonal antibodies for flow cytometric detection of intracellular *Toxoplasma gondii* in murine splenic lymphocytes.
J Parasitol 2004 ; 90 (1) : 161-6.
193. SIBLEY LD, ADAMS LB, FUKUTOMI Y, KRAHENBUHL JL.
Tumor Necrosis Factor-alpha triggers antitoxoplasmal activity of IFN-gamma primed macrophages.
J Immunol 1991 ; 147 (7) : 2340-5.
194. SIBLEY L, BOOTHROYD JC.
Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single lineage.
Nature 1992 ; 359 : 82-5

195. SIBLEY LD, MORDUE D, HOWE DK.
Experimental approaches to understanding virulence in toxoplasmosis.
Immunobiol, 1999 ; 201 (2) : 210-24.
196. SINAI A, PAYNE T, CARMEN J, HARDI L, WATSON S, MOLESTINA R.
Mechanisms underlying the manipulation of host apoptotic pathways by *Toxoplasma gondii*.
Int J Parasitol 2004 ; 34 (3) : 381-91.
197. STEWARD MW, HOWARD CR.
Synthetic peptides: a next generation of vaccine?
Immunol Today 1987 ; 8 : 51-7.
198. SU C, HOWE DK, DUBEY JP, AJIOKA JW, SIBLEY LD.
Identification of quantitative trait loci controlling acute virulence in *Toxoplasma gondii*.
Proc Natl Acad Sci U S A 2002 ; 99 (16) :10753-8.
199. SU C, EVANS D, COLE RH, KISSINGER JC, AJIOKA JW, SIBLEY LD.
Recent expansion of *Toxoplasma* through enhanced oral transmission.
Science 2003 ; 299 (5605) : 414-6.
200. SUBAUSTE CS, KONIARIS AH, REMINGTON JS.
Murine CD8+ cytotoxic T lymphocytes lyse *Toxoplasma gondii*-infected cells.
J Immunol 1991 ; 147 (11) : 3955-9.
201. SUBAUSTE CS, REMINGTON JS.
Role of gamma-Interferon in *Toxoplasma gondii* infection.
Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1991 ; 10 (2) : 58-67.
202. SUBAUSTE CS, REMINGTON JS.
Immunity to *Toxoplasma gondii*.
Curr Opin Immunol 1993 ; 5 (4) : 532-7.
203. SUBAUSTE CS, FUH F, DE WAAL MALEFYT R, REMINGTON J.
 α/β T cell response to *Toxoplasma gondii* in previously unexposed individuals.
J Immunol 1998 (a) ; 160 (7) : 3403-11.
204. SUBAUSTE C, WESSENDARP M.
Human dendritic cells discriminate between viable and killed *Toxoplasma gondii* tachyzoites: dendritic cell activation after infection with viable parasites results in CD28 and CD40 ligand signalling that controls IL-12-dependent and independent T cell production of IFN- γ .
J Immunol 2000 ; 165 (3) : 1498-505.
205. SUZUKI Y, REMINGTON JS.
Dual regulation of resistance against *Toxoplasma gondii* infection by Lyt-2+ and Lyt-1+, L3T4+ T cells in mice.
J Immunol 1988 ; 140 (11) : 3943-6.
206. SUZUKI Y, ORELLANA MA, SCHREIBER RD, REMINGTON JS.
Interferon-gamma: the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*.
Science 1988 ; 240 (4851) : 516-8.
207. SUZUKI Y, YANG Q, YANG S, NGUYEN N, LIM S, LIESENFELD O et al.
IL-4 is protective against development of toxoplasmic encephalitis.
Immunol 1996 ; 157 (6) : 2564-9.

208. SUZUKI Y, SHER A, YAP G, PARK D, NEYER LE, LIESENFELD O et al.
IL-10 is required for prevention of necrosis in the small intestine and mortality in both genetically resistant BALB/c and susceptible C57BL/6 mice following peroral infection with *Toxoplasma gondii*.
J Immunol 2000 ; 164 (10) : 5375-82.
209. SWIERCZYNSKI B, BESSIERES MH, CASSAING S, GUY S, OSWALD I, SEQUELA JP et al.
Inhibitory activity of anti-interleukin-4 and anti-interleukin-10 antibodies on *Toxoplasma gondii* proliferation in mouse peritoneal macrophages cocultured with splenocytes from infected mice.
Parasitol Res 2000 ; 86 (2) : 151-7.
210. TOMAVO S, FORTIER B, SOETE M, ANSEL C, CAMUS D, DUBREMETZ JF.
Characterization of bradyzoite-specific antigens of *Toxoplasma gondii*.
Infect Immun 1991 ; 59 (10) : 3750-3.
211. TOMAVO S.
The major surface proteins of *Toxoplasma gondii*: structures and functions.
Curr Top Microbiol Immunol 1996 ; ;219 : 45-54.
212. TOMAVO S.
The differential expression of multiple isoenzyme forms during stage conversion of *Toxoplasma gondii*: an adaptative developmental strategy.
Int J Parasitol 2001 ; 31 : 1023-31.
213. VALLOCHI AL, MUCCIOLI C, MARTINS MC, SILVEIRA C, BELFORT R JR, RIZZO LV.
The genotype of *Toxoplasma gondii* strains causing ocular toxoplasmosis in humans in Brazil.
Am J Ophthalmol 2005 ; 139 (2) : 350-1.
214. VAN DER POUW KRAAN TC, SNIJDERS A, BOEIJE LC, DE GROOT ER, ALEWIJNSE AE, LEURS R et al.
Histamine inhibits the production of interleukin-12 through interaction with H2 receptors.
J Clin Invest 1998 ; 102 (10) : 1866-73.
215. VELGE-ROUSSEL F, MORETTO M, BUZONI-GATEL D, DIMIER-POISSON I, FERRER M, HOEBEKE J et al.
Differences in immunological response to a *T gondii* protein (SAG1) derived peptide between two strains of mice: effect on protection in *T gondii* infection.
Mol Immunol 1997 ; 34 (15) : 1045-53.
216. VELGE-ROUSSEL F, DIMIER-POISSON I, BUZONI-GATEL D, BOUT D.
Anti-SAG1 peptide antibodies inhibit the penetration of *Toxoplasma gondii* tachyzoites into enterocyte cell lines.
Parasitol 2001 ; 123 (Pt 3) : 225-33.
217. VERCAMMEN M, SCORZA T, HUYGEN K, DE BRAEKELEER J, DIET R, JACOBS D et al.
DNA vaccination with genes encoding *Toxoplasma gondii* antigens GRA1, GRA7, and ROP2 induces partially protective immunity against lethal challenge in mice.
Infect Immun 2000 ; 68 (1) : 38-45.

218. VERHASSELT V, BUELENS C, WILLEMS F, DE GROOTE D, HAEFFNER-CAVAILLON N, GOLDMAN M.
Bacterial lipopolysaccharide stimulates the production of cytokines and the expression of costimulatory molecules by human peripheral blood dendritic cells: evidence for a soluble CD14-dependent pathway.
J Immunol 1997 ; 158 (6) : 2919-25.
219. VIEIRA PL, DE JONG EC, WIERENGA EA, KAPSENBERG ML, KALINSKI P.
Development of Th1-inducing capacity in myeloid dendritic cells requires environmental instruction.
J Immunol 2000 ; 164 (9) : 4507-12.
220. VILLAVEDRA M, BATTISTONI JJ, ROSSI S, CAROL H, NIETO A.
Avidity analysis of the human immune response to a chitin binding protein of *Toxoplasma gondii*.
Int J Parasitol 2001 ; 31 (10) : 1087-92.
221. VILLEGAS EN, LIEBERMAN LA, CARDING SR, HUNTER CA.
Susceptibility of interleukin-2-deficient mice to *Toxoplasma gondii* is associated with a defect in the production of gamma interferon.
Infect Immun 2002 ; 70 (9) : 4757-61.
222. VILLENA I, MARLE M, DARDE ML, PINON JM, AUBERT D.
Toxoplasma strain type and human disease: risk of bias during parasite isolation?.
Trends Parasitol 2004 ; 20 (4) : 160-2.
223. VOSENKAMPER A, STRUCK D, ALVARADO-ESQUIVEL C, WENT T, TAKEDA K, AKIRA S, et al..
Both IL-12 and IL-18 contribute to small intestinal Th1-type immunopathology following oral infection with *Toxoplasma gondii*, but IL-12 is dominant over IL-18 in parasite control.
Eur J Immunol 2004 ; 34 (11) : 3197-207.
224. WILLE U, NISHI M, LIEBERMAN L, WILSON EH, ROOS DS, HUNTER CA.
IL-10 is not required to prevent immune hyperactivity during memory responses to *Toxoplasma gondii*.
Parasite Immunol 2004 ; 26 (5) : 229-36.
225. WINDECK T, GROSS U.
Toxoplasma gondii strain-specific transcript levels of SAG1 and their association with virulence.
Parasitol Res 1996 ; 82 : 715-9.
226. YAMAMOTO JH, VALLOCHI AL, SILVEIRA C, FILHO JK, NUSSENBLATT RB, CUNHA-NETO E et al.
Discrimination between patients with acquired toxoplasmosis and congenital toxoplasmosis on the basis of the immune response to parasite antigens.
J Infect Dis 2000 ; 181 (6) : 2018-22.
227. YANG CD, CHANG GN, CHAO D.
Protective immunity against *Toxoplasma gondii* in mice induced by a chimeric protein rSAG1/2.
Parasitol Res 2004 ; 92 (1) : 58-64.

228. YAP G, PESIN M, SHER A.
Cutting edge: IL-12 required for the maintenance of IFN- γ production in T cells mediating chronic resistance to the intracellular pathogen, *Toxoplasma gondii*.
J Immunol 2000 ; 165 (2) : 628-31.
229. YE P, RODRIGUEZ FH, KANALY S, STOCKING KL, SCHURR J, SCHWARZENBERGER P et al.
Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense.
J Exp Med 2001 ; 194 (4) : 519-27.
230. ZHANG Y, DENKERS EY.
Protective role for interleukin-5 during chronic *Toxoplasma gondii* infection.
Infect Immun 1999 ; 67 (9) : 4383-92.
231. ZHOU L-J, TEDDER T.
CD14+ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83+ dendritic cells.
Proc Natl Sci USA 1996 ; 93 : 2588-92.

Annexes

Liste des publications

I. VILLENA, **M. MARLE**, M.L. DARDÉ, J.M. PINON AND D. AUBERT.

Toxoplasma strain type and human disease : risk of bias during parasite isolation ?

Trends in Parasitology, 2004, 20, 4, 160-162.

**M. MARLE-PLISTAT, R. LE NAOUR, I. VILLENA, J.M. PINON, M. GUENOUNOU
AND D. AUBERT.**

Toxoplasma gondii SAG1 derived peptides: Recognition by human sera and protective immunity against infection in mice.

Soumis à Parasite en Juin 2005.

**M. MARLE-PLISTAT, D. AUBERT, T. BARANEK, I. VILLENA, M. GUENOUNOU, J.M.
PINON AND R. LE NAOUR.**

Peptides derived from two different alleles of SAG1 discriminating type I from non-type I *Toxoplasma gondii* strains induce differential cytokine production by immature human dendritic cells.

Soumis à Journal of Immunology en juillet 2005.

Communications orales

C1 : **M. MARLE**, D. AUBERT, R. LE NAOUR, I. VILLENA, J.Y. LARONZE, M. GUENOUNOU, J.M. PINON. Variabilité génomique de la protéine majeure de surface SAG1 de *Toxoplasma gondii*. Club Toxo 2002, Paris, France, 2002.

C2 : **M. MARLE**, D. AUBERT, R. LE NAOUR, JM. PINON, I VILLENA. Gène GRA7: typage moléculaire de souches de *Toxoplasma gondii*. SBR 2003, Société de Biologie de Reims, Reims, France, 2003

C3 : **M. MARLE-PLISTAT**, D. AUBERT, I. VILLENA, J.Y LARONZE, M. GUENOUNOU, P. NGUYEN, J.M. PINON, R. LE NAOUR. Peptide de *Toxoplasma gondii* et régulation différentielle de la production de cytokines par les cellules dendritiques humaines. Club Toxo 2004, Paris, France, 2004.

C4 : I. VILLENA, **M. MARLE**, D. AUBERT, F. FOU DRINIER, P. HORNOY, JM. PINON. Diagnostic de la toxoplasmose congénitale : l'inoculation à la souris peut-elle occulter les infestations mixtes ? SFP 2003, Marseille, France, 2003.

Communications affichées

C1 : **M. MARLE**, D. AUBERT, J. DEPAQUIT, J. BOULANT, JM. PINON, I. VILLENA. Toxoplasmose congénitale: typage génomique de souches de *Toxoplasma gondii* isolées de prélèvements pathologiques. SFP 2002, Société Française de parasitologie, Maison Alfort, France 2002.

C2 : I. VILLENA, **M. MARLE**, D. AUBERT, H. LEPAN, JM. PINON. Intérêt de l'étude des surnageants de liquide amniotique pour le diagnostic et le typage génomique des toxoplasmoses congénitales. SFP 2002, Maison Alfort, France 2002.

C3 : **M. MARLE**, D. AUBERT, R. LE NAOUR, JM. PINON, I VILLENA. Gène GRA7: typage moléculaire de souches de *Toxoplasma gondii*. Journée jeunes chercheurs de l'IFR53, Reims, France, 2003.

C4: **M. MARLE**, D. AUBERT, ML. DARDE, JM. PINON, I. VILLENA. GRA7-based molecular typing of *Toxoplasma gondii* strains. New York, USA, 2003.

C5 : I. VILLENA, **M. MARLE**, D. AUBERT, F. FOU DRINIER, ML. DARDE, C. CLAVEL, JM. PINON. Diagnosis of congenital toxoplasmosis: does mouse inoculation miss mixed infection? New York, USA, 2003.

C6 : **M. MARLE-PLISTAT**, D. AUBERT, I. VILLENA, J.Y LARONZE, M. GUENOUNOU, P. NGUYEN, J.M. PINON, R. LE NAOUR. Régulation différentielle de la production de cytokines par les cellules dendritiques humaines activées par des peptides de *Toxoplasma gondii*. Journée jeunes chercheurs de l'IFR53, Reims, France, 2004.

Article 1 : *Toxoplasma* strain type and human disease : risk of bias during parasite isolation ?

- 15 Plebanski, M. *et al.* (1997) Immune evasion in malaria: altered peptide ligands of the circumsporozoite protein. *Parasitology* 115 (Suppl), S55–S66
- 16 Ramshaw, I.A. and Ramsay, A.J. (2000) The prime-boost strategy: exciting prospects for improved vaccination. *Immunol. Today* 21, 163–165
- 17 Schneider, J. *et al.* (1999) Induction of CD8+ T cells using heterologous prime-boost immunisation strategies. *Immunol. Rev.* 170, 29–38
- 18 Apostolopoulos, V. and Plebanski, M. (2000) The evolution of DNA vaccines. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 2, 441–447
- 19 Wang, R. *et al.* (1998) Induction of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes in humans by a malaria DNA vaccine. *Science* 282, 476–480
- 20 Ockenhouse, C.F. *et al.* (1998) Phase I/IIa safety, immunogenicity, and efficacy trial of NYVAC-Pf7, a pox-vectored, multiantigen, multistage vaccine candidate for *Plasmodium falciparum* malaria. *J. Infect. Dis.* 177, 1664–1673
- 21 Flanagan, K.L. *et al.* (2003) *Ex vivo* interferon-gamma immune response to thrombospondin-related adhesive protein in coastal Kenyans: longevity and risk of *Plasmodium falciparum* infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 68, 421–430
- 22 Roy, M.J. *et al.* (2000) Induction of antigen-specific CD8+ T cells, T helper cells, and protective levels of antibody in humans by particle-mediated administration of a hepatitis B virus DNA vaccine. *Vaccine* 19, 764–778
- 23 Degano, P. *et al.* (1999) Gene gun intradermal DNA immunization followed by boosting with modified vaccinia virus Ankara: enhanced CD8+ T cell immunogenicity and protective efficacy in the influenza and malaria models. *Vaccine* 18, 623–632
- 24 Gilbert, S.C. *et al.* (2002) Enhanced CD8 T cell immunogenicity and protective efficacy in a mouse malaria model using a recombinant adenoviral vaccine in heterologous prime-boost immunisation regimes. *Vaccine* 20, 1039–1045
- 25 Rogers, W.O. *et al.* (2001) Multistage multiantigen heterologous prime boost vaccine for *Plasmodium knowlesi* malaria provides partial protection in rhesus macaques. *Infect. Immun.* 69, 5565–5572

1471-4922/\$ - see front matter © 2004 Elsevier Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.pt.2004.01.013

***Toxoplasma* strain type and human disease: risk of bias during parasite isolation?**

Isabelle Villena¹, Maggy Marle¹, Marie-Laure Dardé², Jean-Michel Pinon¹
Dominique Aubert¹

¹Department of Parasitology, EA 2070, IFR53, UFR Médecine, Hôpital Maison-Blanche, 45 Rue Cognacq-Jay, 51092 Reims Cedex, France

²Department of Parasitology, EA 3174, Faculté de Médecine, 2 rue Dr Marcland, 87025 Limoges, France

A recent publication has described for the first time the use of restriction analysis directly on biological samples to show the high frequency of multiple *Toxoplasma gondii* infection in individual patients. However, no mixed infection has been reported in other studies, and no cases have yet been identified either by inoculation of mice or *in vitro* culture. Here, we discuss the possibility that the parasite isolation process could represent a risk of bias in the type determination of the *Toxoplasma* strain responsible for infection.

Toxoplasmosis is a zoonotic disease caused by the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. Most human infections are subclinical, but infection during pregnancy can be fatal for the fetus or newborn. Chronic infections persist for years and can reactivate, causing severe disease in immunocompromised patients. Recent data suggest that some of the clinical variability of *T. gondii* infection could be associated with the strain type. *Toxoplasma* strains have been subdivided into two main clonal groups, which include the three clonal lineage Types I, II and III [1]. Boothroyd reported that different strains could cause different diseases [2]. However, whereas data on acquired ocular toxoplasmosis in immunocompetent patients suggest a predominance of Type I or atypical strains, the relationship is less obvious in congenital toxoplasmosis.

Type I and atypical strains have never been reported in asymptomatic or benign congenital toxoplasmosis [3,4], although cases of severe and fatal toxoplasmosis have been observed with Type II isolates. For the first time, it has recently been reported [5,6] that multi-genotype infections are common in animals and humans. By contrast, no cases of mixed human infection have ever been identified by mouse inoculation or *in vitro* culture; consequently, we draw attention here to the possibility that the parasite isolation process could result in a single strain, even if several strains were found in the inoculum.

Aspinall detected cases of multiple *Toxoplasma gondii* infection in individual patients in England and Wales [5]. Samples from 32 cases of human toxoplasmosis, including immunosuppressed or immunocompetent patients and cases of congenital toxoplasmosis, were studied. Both restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis on the surface antigen *SAG2* gene, as described by Howe *et al.* [7], and independent sequencing has shown the unexpected presence of mixed infection (both *SAG2* Types I and II) in the PCR products. Surprisingly, the frequency of mixed infections was similar to that of infections due solely to Type I or Type II strains. By contrast, the study of Costa *et al.* [8], the first to be performed directly on biological samples (37 amniotic fluid samples), reported no mixed infection by analysis of a microsatellite in the gene encoding *T. gondii* β -tubulin. In the same way, Fuentes *et al.* [4] performed *SAG2* typing in 34 clinical samples

Corresponding author: Isabelle Villena (ivillena@chu-reims.fr).

collected from immunocompromised patients and cases of congenital infection, and found only one type responsible for infection. Grigg *et al.* showed an unusual abundance of SAG2 Type I parasite and recombinant genotypes on multilocus RFLP analyses [9] associated with human ocular disease. However, Aspinall *et al.* suggested that differences in sample processing and PCR methodology could lead to differences in the sensitivity of mixed genotype detection [5]. In our experience using >30 amniotic fluids, only one mixed infection (Type I and II) was detected by direct typing on biological samples; interestingly, murine inoculation of the sample led to only one Type II strain isolation*.

Mixed infections in toxoplasmosis

All studies found evidence for a clonal population structure of *T. gondii*, comprising independently propagating clones as a result of carnivorous transmission and to the usual lack of re-infection both in the intermediary and definitive host [10]. However, in mice, Araujo *et al.* [11] and Dao *et al.* [12] suggested that the immune protection conferred by one strain could be breached by re-infection with a strain belonging to another genotype. Sexual reproduction in cats occurs during a short period following primary infection. Studies based on feeding infected tissues to cats found no evidence for multiple strains in the resulting oocysts [13]. In a natural population, parasite propagation with sexual recombination between two strains occurred infrequently, although mixed infections have been reported experimentally using animal models: experimental infection by Type II and Type III strains can produce viable progeny in cats [14,15]. As detected by parasite isolation after mouse inoculation, the frequency of double infections in animals in the wild is weak [15]. For instance, using high-resolution microsatellite analysis, only one infection by two different Type II isolates was reported in an aborted sheep [1]. For Aspinall *et al.*, the presence of more than one type of parasite in individual human samples might be related to food-borne infection. They previously reported the presence of mixed *T. gondii* strains (Type I and II) in commercial meat products derived from the ingestion of a mixed meat product originating from multiple animals containing parasites of more than one type [6]. In their study, detection of *Toxoplasma gondii* in commercial meat products was purely by PCR, so there was no distinction between isolation of viable parasites (which could lead to human contamination) and *Toxoplasma* DNA from dead parasites (unable to be transmitted). Because Warnekulasuriya *et al.* [16] detected viable *T. gondii* (by bioassay) in one out of 67 ready-to-eat cured meat samples, this food-borne route could be an occasional way for human contamination. Further studies, taking into account the mode of preparation of these cured meat samples, will be necessary to assess the place of this food-borne route in the contamination of humans.

Published data on strain typing point to a possible selection bias of parasite isolation by mouse inoculation or

cell culture. There is a duality of results observed between typing on primary clinical samples (an increased frequency of Type I strain and mixed infection as reported by Aspinall *et al.*) and typing on strains isolated after mouse inoculation (a majority of Type II strain without mixed infection). Epidemiology and recruitment of patients could also explain differences between these studies: direct typing detected a high frequency of Type I associated with human toxoplasmosis in England and Wales [5] and in Spain [4], in contrast to only Type II in France [8]. By mouse inoculation or *in vitro* culture, Type II was found in a majority of the human toxoplasmosis cases in Europe and USA, and no cases of mixed human infection have yet been identified. The use of cell culture or mice to isolate and grow the parasite could create a biased sampling for subsequent parasite genotype determination. This could affect the observed genotype frequency, owing to differential strain selection, with over-representation of strains adapted to growth in culture or in mice [4,5,8]. However, experimentally, a Type I *Toxoplasma* strain mixed with a Type II strain is responsible for the death of inoculated mice, so that a higher frequency of Type I, rather than Type II, should be detected by mouse inoculation. Similarly, the high rate of multiplication of the Type I strain in cell culture will favor this kind of strain.

PCR itself, both when performed in mouse brain or in clinical samples, could lead to the mis-identification of mixed infection because of competition for primers during the PCR assay, and dispersion of parasites in tissues (the DNA extraction performed on a small sample of tissue can detect one type of parasite, the other one being in another part of the sample).

Future implications

High-resolution classification (strain typing) is a prerequisite to study the association between genetically defined subpopulations (strains) and attributes such as disease severity [17,18]. Another prerequisite is to use a panel of tests that can identify all the strains present. Direct typing on primary clinical samples (amniotic fluid and/or placenta), isolates, histological samples, or serotyping with synthetic peptides [19] could help to determine the *T. gondii* strain type responsible for clinical lesions and to explore the correlation between the strain type and human disease. Further studies using highly discriminative markers such as microsatellites are required to appreciate the real frequency of mixed-strain infections in human toxoplasmosis. Thus, the presence of these mixed-strain infections in primary samples could demonstrate a possible selection bias in parasite isolation.

Acknowledgements

This work was supported by Programme Hospitalier de Recherche Clinique (Centre Hospitalier Universitaire de Reims) and Centre de Ressources Biologiques Toxoplasme (TOXO BS) (Ministère de la Recherche, Paris). M.M. is the recipient of a grant from Region Champagne-Ardenne. We thank David Young for checking our use of English.

References

- 1 Ajzenberg, D. *et al.* (2002) Microsatellite analysis of *Toxoplasma gondii*

* Villena, I. *et al.* (2003) Diagnosis of congenital toxoplasmosis: does mouse inoculation miss mixed infection? Abstract no. 72, VII International Congress on Toxoplasmosis, held 23–27 May 2003 in Tarrytown, New York.

- shows considerable polymorphism structured into two main clonal groups. *Int. J. Parasitol.* 32, 27–38
- 2 Boothroyd, J.C. and Grigg, M.E. (2002) Population biology of *Toxoplasma gondii* and its relevance to human infection: do different strains cause different disease? *Curr. Opin. Microbiol.* 5, 438–442
 - 3 Ajzenberg, D. *et al.* (2002) Genotype of 86 *Toxoplasma gondii* isolates associated with human congenital toxoplasmosis and correlation with clinical findings. *J. Infect. Dis.* 186, 684–689
 - 4 Fuentes, I. *et al.* (2001) Genotypic characterization of *Toxoplasma gondii* strains associated with human toxoplasmosis in Spain: direct analysis from clinical samples. *J. Clin. Microbiol.* 39, 1566–1570
 - 5 Aspinall, T.V. *et al.* (2003) Molecular evidence for multiple *Toxoplasma gondii* infections in individual patients in England and Wales: public health implications. *Int. J. Parasitol.* 33, 97–103
 - 6 Aspinall, T.V. *et al.* (2002) Prevalence of *Toxoplasma gondii* in commercial meat products as monitored by polymerase chain reaction – food for thought? *Int. J. Parasitol.* 32, 1193–1199
 - 7 Howe, D.K. *et al.* (1997) Determination of genotypes of *Toxoplasma gondii* isolated from patients with toxoplasmosis. *J. Clin. Microbiol.* 35, 1411–1414
 - 8 Costa, J.M. *et al.* (1997) Microsatellite in the beta-tubulin gene of *Toxoplasma gondii* as a new genetic marker for use in direct screening of amniotic fluids. *J. Clin. Microbiol.* 35, 2542–2545
 - 9 Grigg, M.E. *et al.* (2001) Unusual abundance of atypical strains associated with human ocular toxoplasmosis. *J. Infect. Dis.* 184, 633–639
 - 10 Grigg, M.E. and Suzuki, Y. (2003) Sexual recombination and clonal evolution of virulence in *Toxoplasma*. *Microbes Infect.* 5, 685–690
 - 11 Araujo, F. *et al.* (1997) Chronic infection with *Toxoplasma gondii* does not prevent acute disease or colonization of the brain with tissue cysts following reinfection with different strains of the parasite. *J. Parasitol.* 83, 521–522
 - 12 Dao, A. *et al.* (2001) Successful reinfection of chronically infected mice by a different *Toxoplasma gondii* genotype. *Int. J. Parasitol.* 31, 63–65
 - 13 Dubey, J.P. *et al.* (2002) Biological and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens (*Gallus domesticus*) from Sao Paulo, Brazil: unexpected findings. *Int. J. Parasitol.* 32, 99–105
 - 14 Pfefferkorn, E.R. and Pfefferkorn, L.C. (1976) *Toxoplasma gondii*: isolation and preliminary characterization of temperature-sensitive mutants. *Exp. Parasitol.* 39, 365–376
 - 15 Howe, D.K. and Sibley, L.D. (1995) *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *J. Infect. Dis.* 172, 1561–1566
 - 16 Warnekulasuriya, M.R. *et al.* (1998) Detection of *Toxoplasma gondii* in cured meats. *Int. J. Food Microbiol.* 45, 211–215
 - 17 Lehmann, T. *et al.* (2000) Strain typing of *Toxoplasma gondii*: comparison of antigen-coding and housekeeping genes. *J. Parasitol.* 86, 960–971
 - 18 Blackston, C.R. *et al.* (2001) High-resolution typing of *Toxoplasma gondii* using microsatellite loci. *J. Parasitol.* 87, 1472–1475
 - 19 Kong, J.T. *et al.* (2003) Serotyping of *Toxoplasma gondii* infections in humans using synthetic peptides. *J. Infect. Dis.* 187, 1484–1495

1471-4922/\$ - see front matter © 2004 Elsevier Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.pt.2004.01.009

Research Focus Response

Response to Villena *et al.*: *Toxoplasma* strain type and human disease

Tanya V. Aspinall¹, Edward C. Guy², Katherine E. Roberts², David H.M. Joynton²,
John E. Hyde¹ and Paul F.G. Sims¹

¹Department of Biomolecular Sciences, University of Manchester Institute of Science and Technology, PO Box 88, Sackville Street, Manchester, M60 1QD, UK

²*Toxoplasma* Reference Unit, Public Health Laboratory, Swansea UK SA2 8QA

Recent work has confirmed our earlier assertion that cases of human toxoplasmosis can involve more than one parasite type. This possibility might not have been previously observed because parasite samples studied by earlier workers had been subjected to extended passage through mice. We thus agree with the suggestion that future work examining the relationship between *Toxoplasma* strain type and human disease should be confined to the analysis of primary clinical material.

Villena *et al.* highlight differences between previously published work and our recent analysis of *Toxoplasma* strain types associated with acute human infections [1]. In particular, they point out that our data, obtained using direct PCR amplification from clinical samples, identified a significant number of cases involving more than one type of parasite, whereas previous studies, most of which have analyzed parasites obtained after passage through mice, have identified only a single parasite type associated

with each infection. They report a case where, although a mixture of parasite types was identified by direct PCR analysis of primary material, only a single type was detected using the same methodology after mouse culture. Because Villena *et al.* conclude that parasite isolation can resolve a mixture of parasites into an apparently pure isolate, they recommend that similar studies should, in future, use only direct typing of primary samples.

We are pleased that Villena *et al.* support our view that mixed infections can be associated with human disease. Moreover, this view is further reinforced by the work of Kong *et al.* who, using synthetic peptides to serotype primary material, also presented evidence of an infection involving more than one parasite type [2]. Thus, we now have evidence that a single infection can involve multiple parasite types, which has been obtained by three different groups using two different analysis methods.

The data presented by Villena *et al.* demonstrate that the involvement of more than one parasite type can be missed if samples are analyzed after mouse culture.

Corresponding author: Paul F.G. Sims (p.sims@umist.ac.uk).

Article 2 : *Toxoplasma gondii* SAG1 derived peptides: Recognition by human sera and protective immunity against infection in mice.

***Toxoplasma gondii* SAG1 derived peptides:
Recognition by human sera and protective immunity
against infection in mice.**

M. Marlé-Plistat^{1, 2}, R. Le Naour², I. Villena¹, J.M Pinon¹, M. Guenounou² and D. Aubert*¹.

¹ Department of Parasitology and Mycology, EA 3800, IFR53, UFR Médecine, 51 Rue Cognacq-Jay, 51095 Reims Cedex, France.

² Department of Immunology, IPCM, EA 3796, IFR53, UFR Pharmacie, 51 Rue Cognacq-Jay, 51095 Reims Cedex, France.

*Corresponding author:

Dominique Aubert, Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, EA3800, IFR53, 51 rue Cognacq-Jay, 51096 Reims cedex, France.

Tel: +333-2691-8089; Fax: +333-2691-8164.

E-mail address: daubert@chu-reims.fr (D. Aubert)

Summary: *Toxoplasma gondii* SAG1 derived peptides: Recognition by human sera and protective immunity against infection in mice.

SAG1 is recognized as a major *Toxoplasma* antigen because of highly immunogenicity. Using predictive algorithms and SAG1 polymorphism sites localisation, we selected two allele specific peptides, distinguishing type I strains from type II/III. A third peptide of SAG1, already described for potent antigenic and immunogenic properties in rat, was also studied. By ELISA, peptides were recognized by human sera. The protective effect of peptides was evaluated in mice challenged with type II avirulent strain. Only allele specific peptides, induced a partial protection during chronic infection with reduction of the brain parasite load. The choice of peptide is crucial, since a modification of some amino acids can lead to a modulation of their antigenicity and immunogenicity.

Keywords: *Toxoplasma gondii*, SAG1, allele specific peptides, protection.

Résumé: Peptides dérivés de la protéine SAG1 de *Toxoplasma gondii*: Reconnaissance par des sérums humains et protection lors d'une infection chronique chez la souris.

SAG1 est une protéine majeure de surface de *Toxoplasma gondii* hautement immunogène. En combinant un algorithme prédictif et la localisation des sites de polymorphisme chez SAG1, nous avons sélectionné deux peptides spécifiques d'allèles séparant les souches de type I des II/III. Un troisième peptide de SAG1, décrit pour ses propriétés antigéniques et immunogènes chez le rat, est aussi étudié. En ELISA, les peptides sont reconnus par des sérums humains. Pour analyser leur effet protecteur, des souris immunisées ont été infestées avec une souche avirulente de type II. Seuls les peptides spécifiques d'allèles ont induit une protection partielle avec réduction de la charge parasitaire. Le choix du peptide est crucial, puisqu'une modification de quelques acides aminés peut mener à une modulation de leur antigénicité et de leur immunogénicité.

Mots clés: *Toxoplasma gondii*, SAG1, peptides spécifiques d'allèles, protection.

INTRODUCTION

Toxoplasma gondii is a protozoan parasite responsible for widespread infections among mammals and birds, which provide a transmissible source of human infection. Toxoplasmosis is generally asymptomatic or causes very mild symptoms, but it can be severe in two populations, namely congenitally infected children and immunocompromised patients. The severity of the disease is determined by the host genotype, however, this is likely that isolates of *Toxoplasma* vary in virulence (Boothroyd and Grigg, 2002). *T.gondii* has an unusual clonal population structure comprised mainly of three widespread genotypes referred to as “type I, II or III”. Type I represents strains highly virulent in mice, type II, avirulent strains and type III, strains with an intermediate virulence. The majority of human strains (80 %), which were isolated from immunocompromised patients and children having congenital toxoplasmosis, belong to type II. Type III strains are usually associated with animals infections. The level of polymorphism represents only 1% to 3% in *T.gondii*. Grigg et al. (2001) showed that this polymorphism was limited to two rather than three allelic classes. Recent data suggest strain genotype was determining factor in severity of the disease in humans. Moreover, type I is often responsible for serious infections in humans.

T.gondii stimulates a strong humoral immune response in hosts that is strain specific (Parmley et al., 1994). SAG1 is a highly immunogenic protein that has a major interest in humoral response. This native or recombinant protein, used in congenital and acquired toxoplasmosis serodiagnosis, induces high antibody titers in human and is recognized by all sera from seropositive subjects (Potasman et al., 1986). The immune response to antigens involves specific antigen receptors on B and T-cells. Identification of the determinants recognized by the receptors, which elicit specific humoral and cellular immune response, has important implications for diagnosis and vaccinal strategy against *T.gondii*.

Two allele specific peptides derived from SAG1 were selected according polymorphism sites and predictive algorithms. We also tested a third peptide, described by Godard et al.

(1994), which sequence was shifted compared to these peptides. This peptide was reported potent antigenicity and immunogenicity properties in rat. In this study, we developed an enzyme-linked immunosorbent assay that uses human sera reacted against allele specific peptides. In second part, we evaluated protective effects of peptides in murin model against chronic infection of *Toxoplasma gondii*. This present study describes the immunogenic, antigenic potential and protective properties of these peptides.

MATERIALS AND METHODS

PARASITES

The RH strain (Type I) of *T.gondii* was maintained by serial intraperitoneal passage in Swiss mice (Charles River Laboratory, France) and tachyzoites were used to prepare *T.gondii* sonicate antigen (TSA). Tachyzoites of the PRU strain (Type II) were obtained from brain cysts of chronically infected mice, after multiplication in THP1 cells.

SELECTION OF SAG1 PEPTIDE SEQUENCES

Nucleotide sequences were obtained by direct sequencing for surface antigen SAG1 of 8 strains including type I (RH), II (PRU, RMS-1999-BES and RMS-2000-TRA), III (NED) and atypical (RMS-2001-MAU, RUB and MAS) strains. Polymorphic regions were identified after alignment of all SAG1 sequences. We selected three peptides: a SAG1 peptide already described (Godard et al., 1994) and two allele specific peptides chosen according to predictive algorithm Alix (1999) based on the following criteria: secondary structure, hydrophilicity, surface accessibility and flexibility.

PEPTIDES

Peptides were obtained by solid phase synthesis using a Fmoc [*N*-(9-fluorenyl)-methoxycarbonyl] derivative procedure and were purified further by reverse phase high performance liquid chromatography (HPLC) with a C18 column by elution with a gradient of acetonitrile in trifluoroacetic acid, then lyophilized. In order to analyse the purity and the composition of the synthetic peptides, we used the HPLC and the electrospray ionisation mass spectrometry (Pr. Laronze, Reims, France). Free peptides were aliquoted and stored at – 80°C. For ELISA, peptides were coupled to BSA using two different crosslinking agents: glutaraldehyde for the two allele specific peptides and MBS (M-maleimidobenzoil-*N*-hydroxysuccinimide ester) for 238-256/I (Qbiogen, France). Coupled peptides were aliquoted and stored at – 20°C until use.

SERUM FROM T.GONDII-INFECTED HUMAN

We analysed 44 serum samples from adults with acute toxoplasmosis (IgG, IgM and/or IgA positive; n=30) or chronic toxoplasmosis (IgG positive, IgM negative, n=14) and 67 sera from children with congenital toxoplasmosis (positive antenatal investigations of amniotic fluid and/or persistence of anti-*Toxoplasma* antibodies after 1 year of age). In these sera, we analysed typed serum samples (n=25) from 13 children with congenital toxoplasmosis for whom the *Toxoplasma* strain type responsible for infection has been determined by restriction fragment-length polymorphism (RFLP) analysis on SAG1 and SAG2 gene (1 type I, 12 type II).

ELISA PROTOCOL:

For Human Serum

For each peptide, microtiter plates (Nunc maxisorp immuno plates, Denmark) were incubated for 2H at 37°C with 100 µl of coupled peptides (10 µg /ml) in 0.1 M sodium bicarbonate-carbonate pH 9.5. Blocking was carried out with 5% casein (Sigma, France), 2% IgEpal (Sigma, France), 0.1% Tween 20 (Sigma, France) and 20% calf serum (Invitrogen, France) in PBS for the night at room temperature. After washing, sera diluted to 1:100 in 1% casein, 2% IgEpal, 0.1%, Tween 20 and 20% calf serum PBS solution were incubated for 1H at 37°C. After washing, immune complexes were detected by incubation for 1H at 37°C with horseradish peroxidase-labelled goat anti-human immunoglobulins (IgG) (Paris-Biotech, France) at 1:1000 dilution in 1% casein, 2% IgEpal, 0.1% Tween 20 and 20% calf serum PBS solution. Finally, the peroxidase activity was revealed by adding 100 µl of a solution containing O- Phenyl diamine (OPD) (Sigma, France) in citric acid and Na₂HPO₄ pH 5 in the dark. The reaction was stopped by adding 100 µl of 1N HCl. The optical density was read at 490 nm (Dynex Immunoassay System, France). An IgG index was calculated for each test sample as follows: sample OD/0.4 (mean OD of the positive control - mean OD of the negative control). A serum was considered to be positive when IgG index > [IgG index mean + 3 standard deviations (SD) (cut-off value)] where IgG index is that of the tested serum, and IgG index mean and SD are respectively the mean and the SD of the IgG index of human negative sera (n=40).

For Mice Serum

The IgG protocol was the same as described except addition in the sample buffer of urea 1.5 M. For anti-*T.gondii* IgG subclasses (IgG1 and IgG2a) analysis, ELISA protocol was performed with an incubation overnight at 4°C with 100µl of peptide solution (10µg/ml) in 0.1 M sodium bicarbonate-carbonate pH 9.5 followed by a saturation of 30 min at 37°C with blocking solution (20% calf serum in PBS).

IMMUNIZATION PROCEDURE

Five groups (n=10) of female Swiss mice (8 to 10 weeks old, Charles River Laboratory, France) were immunized subcutaneously with 200 µl of solution containing 20 µg of free peptides mixed (1:1) with complete Freund's adjuvant (CFA) or incomplete Freund's adjuvant (IFA). Each mouse received three doses administered at 4 weeks intervals between the first immunization (with CFA) and second (with IFA), and at two weeks intervals between the second and third (with IFA). One group was immunized with adjuvant alone. None immunized mice were used as control.

MOUSE CHALLENGE

Mice were challenged intraperitoneally with 10^4 tachyzoites of type II strain (PRU) one week after the last immunization. Mice were bled before challenge and at 30 days post-infection (time of sacrifice). Brain cyst numbers were quantified: each brain was removed and homogenized in 2 ml of phosphate-buffered saline. The average number of cysts per brain was determined by examining five samples of each homogenate (100 µl each). The results are expressed as mean \pm SD for each group.

WESTERN BLOT ANALYSIS

Briefly, tachyzoites of *T.gondii* RH were washed, sonicated, and centrifuged. The supernatant from the last centrifugation was used as a *T.gondii* sonicate antigen (TSA). The protein concentration of the TSA was determined and aliquots were stored at -20°C until use. Western blotting was carried out on SDS sonicated *T.gondii* antigen (TSA) separated on polyacrylamide gels. Proteins were transferred to nitrocellulose sheet. After transfer, the membrane was blocked in buffer maleate 1X containing 0.5% casein. Strips were incubated with control sera or immunized sera with peptides before and after challenge, diluted at 1:250. The anti-SAG1 GII9 mAb (Argene Biosoft, France) was used at a 1:3000 dilution. The

nitrocellulose membranes were washed in buffer (maleate and 0.1% Tween 20). Peroxydase-labelled anti-mouse IgG, IgG1 or IgG2a, diluted at 1:2000 (Biorad, France), was used as the secondary antibody.

STATISTICAL ANALYSIS

Experimental groups were compared by Chi-square test for ELISA and by analysis of variance (ANOVA) test, for protection. $p < 0.05$ was considered as significant.

RESULTS

T.GONDII ANTIGENIC PEPTIDES

We sequenced coding region of SAG1 gene for 8 strains including type I, II III and atypical, and listed 19 polymorphism sites of which 15 were already published (Bulow and Boothroyd, 1991; Miller et al, 2004). By combining these results with protein areas described as most antigenic (Alix, 1999), we selected two allele specific peptides of 15 amino acids (AA) corresponding to type I (251-265/I: **TENPWQGNASSDKGA**) and to type II/III strains (251-265/II-III: **SENPWQGNASSDNGA**), which are different from two AA (bold type). We used a third SAG1 peptide, CNEKSFKDILPKLTENPWQ, (referred as 238-256/I) already described (Godard et al., 1994) and shifted compared to allele specific peptides.

IMMUNOREACTIVITY OF DIFFERENT PEPTIDES WITH HUMAN SERA

In order to optimize the epitope presentation, we chose a peptide-carrier construct, which allowed a better stability and sensibility of ELISA. Table I showed peptides reactivity in ELISA. To compare results obtained from different experiments, we tested the positive and negative control allowing us to calculate an IgG index. Positive human sera recognized the three peptides. Sera sensitivity was significant between the three peptides ($p < 0.0001$). We showed a significant difference of sensitivity for allele specific peptides (88.6% for 251-265/I

and 72.7% for 251-265/II-III), especially for 251-265/I peptide than for 238-256/I (52.2%). Moreover, it was significant between adult and children sera for 251-265/II-III peptide ($p=0.005$).

In order to determine whether these peptides were recognized by strain-specific antibodies, we tested 25 typed serum samples of children with congenital toxoplasmosis (Table II). ELISA showed a good sensitivity and a better reactivity with allele specific peptides than 238-256/I. The ratio (index 251-265/I / index 251-265/II-III) allowed to establish a partial serotyping test: a ratio of less than 0.8 could have been attributed to sera from children infected by type II strain. Nevertheless, a higher ratio didn't authorize serotyping.

IMMUNE RESPONSE AFTER IMMUNIZATION

To examine the vaccine potential of SAG1 peptides, mice were immunized subcutaneously with peptides and adjuvant or adjuvant alone. IgG antibody titers were determined by ELISA. Only some sera of immunized mice were positive at a dilution of 1:100 (Fig. 1A). In order to appreciate the Th-1/Th-2 dichotomy, we analysed IgG subclasses (IgG1 and IgG2a) of the anti-251-265/I, anti-251-265/II-III and anti-238-256/I antibody response in Swiss mice. Before challenge, only 238-256/I immunized mice developed significant levels of IgG2a antibodies. None of the 3 peptides induced a significant IgG1 antibody level (Fig. 1A). Vaccination with peptide 238-256/I offered a Th-1 type response. After challenge, we showed for allele specific peptides, a significant increase of IgG due to increase of IgG2a levels without differences between 251-265/I and 251-265/II-III immunized mice (Fig. 1B). This significant increase in level IgG of immunized mice was comparable with that of control mice (data not shown).

To demonstrate that the response was mounted only against the SAG1 protein, Western blot analysis was done. Before challenge, sera from mice immunized with 238-256/I were immunoreactive with a protein, identical to this recognized by GII 9, an anti-SAG1 mAb [Fig. 2A (lanes 1 and 10) and Fig. 2B]. Sera from control mice and immunized mice with adjuvant,

251-265/I and 251-265/II-III, did not develop this pattern (Fig. 2A: lanes 2, 4, 6 and 8). After challenge, SAG1-specific isotypes were demonstrated with all the sera (Fig. 2B for 238-256/I peptide and data not shown for allele specific peptides).

PROTECTION

Protective effect of peptides after infestation with a non-lethal strain of *T.gondii* was evaluated. After a third immunization, mice were challenged with 10^4 tachyzoites of the type II strain (PRU). One month after challenge, the protection was determined by the comparison of cysts number in immunized mice *vs* control mice. A significant reduction in the cysts number ($p<0.05$) was observed in immunized mice with peptide 251-265/II-III (Fig. 3). Moreover, number of cysts in immunized mice with 251-265/I, tended to decrease whereas an increase was observed with 238-256/I and adjuvant compared to control mice. These results indicate that only allele specific peptides could induce a partial protection during chronic infection.

However, when mice were challenged by intraperitoneal injection of tachyzoites from highly virulent strain, no difference was noted in the survival: all mice died at one week after infestation (data not shown). None of selected peptides was able to protect mice during *T.gondii* acute infection.

DISCUSSION

Synthetic peptides representing specific regions of proteins can induce both humoral and cellular responses specific to those proteins. Kong et al. (2003) demonstrated the existence of immunodominant and polymorphic antigenic sites in *T.gondii*. Lehmann et al. (2000) showed that 6 out of 7 substitutions found within the region coding for tachyzoite surface antigen SAG2 were non-synonymous, indicating that diversifying selection act on this locus. A higher rate of non-synonymous mutations (8 replacements vs 2 silents) was also found in the coding region of SAG1 (Bulow and Boothroyd, 1991). Moreover, He et al. (2000) reported that, for SAG1, all polymorphisms were detected among allele in D2 domain. During infection, as immunological pressure was exerted on these antigenic zones, we hypothesized that polymorphism areas could have been immunogenic and immunodominant.

We selected two peptides from the SAG1 protein of *T.gondii*, which contained potential antigenic sites based on combined criteria using secondary structure, hydrophilicity, surface accessibility and flexibility. Peptides were selected according to their antigenicity and their polymorphism. This SAG1 area, which presented several polymorphisms, was already explored for these antigenic and immunogenic properties. Godard et al. (1994) showed that the T-cell response from *T.gondii*-infected animals was essentially directed against peptide 238-256/I and elicited B- and T- cell responses. Biesmans et al. (1998) predicted a B-cell epitope to 238-253/I peptide whereas the peptide 261-276/I was not recognized by the serum samples from *T.gondii*-infected animals and/or humans (Kong et al., 2003).

In order to evaluate the seroreactivity of the peptides, the sera from *T.gondii*-positive and-negative individuals were tested. Sensitivity was better for allele specific peptides, (especially 251-265/I) peptide than for 238-256/I. 251-265/II-III peptide discriminated acquired from congenital toxoplasmosis. Modification of some amino acids changes immunoreactivity of a peptide. To determine whether these peptides were sufficiently antigenic to be recognized by strain-specific antibodies in serum of naturally infected humans, we studied a panel of 25

serum samples for which the parasite strain causing infection was known. Unfortunately, our sampling comprised few sera collected from infection due to a large majority of type II. This bias did not allow us to demonstrate the capacity of allele specific peptides to distinguish type I and non type I serotype.

We were interested in examining whether peptide immunization generated a Th-1 and/or Th-2 immune response. We determined the isotype of the anti-peptide antibodies as an indicator of the type of immune response, since it had been shown that IFN- γ secreted by Th-1 cells favours the IgG2a switch, while IgG1 isotype switching was regulated by IL-4 produced by Th-2 cells (Mosmann and Coffman, 1989). Before challenge only IgG2a isotype was found in immunized mice with 238-256/I. Velge-Roussel et al. (1997) found this profil for IgG subclasses after CBA/J mice immunization with SAG1 peptide, 174-212/I. This could indicate a shift towards a more Th-1 like immune response after peptide immunization.

After challenge, we showed for all peptides, a significant increase of IgG2a without IgG1 levels. DNA immunization seemed to develop both IgG1 and IgG2a (Leyva et al., 2001) even when the antibody response to the recombinant SAG1 protein was exclusively an IgG1 response (Letscher-Bru et al., 1998). These results are reminiscent of those reported by Godard et al. (1994) who fragmented SAG1 into five peptides and found that four peptides induced Th-2 cellular immunity (exclusive IgG1 production). Interestingly, peptide 238-251/I was the only one to induce multiple antibody isotypes. We found that Swiss mice developed only IgG2a antibodies in response to peptide immunization, equivalent to the Th-1 type response, which is the natural outcome during infection with live parasite.

In a model of avirulent murin toxoplasmosis, we showed a decrease of the brain cysts number in allele specific peptides immunized mice. We observed an increasing number of cysts for immunization with 238-256/I peptide and adjuvant. Enhanced cysts number in mice immunized with purified, native SAG1 and challenged with a mouse-avirulent cyst forming isolates of *T.gondii*, had previously been reported (Kasper et al., 1985).

In conclusion, polymorphic epitopes derived from SAG1 antigen were sufficiently antigenic to be recognized by *Toxoplasma*-specific antibodies in human serum and immunogenic to reduce the brain parasite load in mice. This study demonstrated antigenicity and immunogenicity of allele specific peptides. Thus, this work shows that the choice of peptide is crucial, since a modification of some amino acids can lead to a modulation of their antigenicity and immunogenicity. It could open the way with the use of selected peptides for the serodiagnosis.

ACKNOWLEDGMENTS

M. Marlé-Plistat is the recipient of a grant from Region Champagne-Ardenne. We thank Régine Geers for assistance in protocoles and Philippe Gomis for carrying out statistics. We thank Jean-Yves Laronze (Department of transformations and synthesis of natural substances, Fre 2715 CNRS, IFR53, Reims, France) for kindly providing SAG1 derived peptides. All animal experiments were carried out according to the European Council on applied animals experiments. Strains were collected by the CRB ToxoBS group (French parasitologist network for *Toxoplasma* strain collection)

REFERENCES

- Alix A.J. Predictive estimation of protein linear epitopes by using the program PEOPLE. *Vaccine*, 1999, 18, 311-314.
- Biemans R., Gregoire D., Haumont M., Bosseloir A., Garcia L., Jacquet A., Dubeaux C. & Bollen A. The conformation of purified *Toxoplasma gondii* SAG1 antigen, secreted from engineered *Pichia pastoris*, is adequate for serorecognition and cell proliferation. *Journal of Biotechnology*, 1998, 66, 137-146.
- Boothroyd J.C. & Grigg M.E. Population biology of *Toxoplasma gondii* and its relevance to human infection: do different strains cause different disease?. *Current Opinion in Microbiology*, 2002, 5, 438-442.
- Bulow R. and Boothroyd J.C. Protection of mice from fatal *Toxoplasma gondii* infection by immunization with P30 antigen in liposomes. *Journal of Immunology*, 1991, 147, 3496-3500.
- Godard I., Estaquier J., Zenner L., Bossus M., Auriault C., Darcy F., Gras-Masse H. & Capron A. Antigenicity and immunogenicity of P30-derived peptides in experimental models of toxoplasmosis. *Molecular Immunology*, 1994, 31, 1353-1363.
- Grigg M.E., Bonnefoy S., Hehl A.B., Suzuki Y. & Boothroyd J.C. Success and virulence in *Toxoplasma gondii* as the result of sexual recombination between two distinct ancestries. *Science*, 2001, 294, 161-165.
- He X.L., Grigg M., Boothroyd J. & Garcia C. Structure of the immunodominant surface antigen from the *Toxoplasma gondii* SRS superfamily. *Nature Structural Biology*, 2000, 9, 606-611.
- Kasper L.H., Currie K.M. & Bradley M.S. Recognition and characterization of stage-specific oocyst/sporozoite antigens of *Toxoplasma gondii* by human antisera. *The Journal of Clinical Investigation*, 1985, 75, 1570-1577.

Kong J.T., Grigg M.E., Uyetake L., Parmley S. & Boothroyd J.C. Serotyping of *Toxoplasma gondii* infections in humans using synthetic peptides. *The Journal of Infectious Diseases*, 2003, 187, 1484-1495.

Lehmann T., Blackston C.R., Parmley S.F., Remington J.S. & Dubey J.P. Strain typing of *Toxoplasma gondii*: comparison of antigen-coding and housekeeping genes. *The Journal of Parasitology*, 2000, 86, 960-971.

Letscher-Bru V., Villard O., Risse B., Zauke M., Klein J.P. & Kien T.T. Protective effect of vaccination with a combination of recombinant surface antigen 1 and interleukin-12 against toxoplasmosis in mice. *Infection and Immunity*, 1998, 66, 4503-4506.

Leyva R., Herion P. & Saavedra R. Genetic immunization with plasmid DNA coding for the ROP2 protein of *Toxoplasma gondii*. *Parasitology Research*, 2001, 87, 70-79.

Miller M.A., Grigg M.E., Kreuder C., James E.R., Melli A.C., Crosbie P.R., Jessup D.A., Boothroyd J.C., Brownstein D. & Conrad P.A. An unusual genotype of *Toxoplasma gondii* is common in California sea otters (*Enhydra lutris nereis*) and is a cause of mortality. *International Journal of Parasitology*, 2004, 34, 275-284.

Mosmann T.R. & Coffman R.L. Th-1 and Th-2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annual Review of Immunology*, 1989, 7, 145-173.

Parmley S.F., Gross U., Sucharczuk A., Windeck T., Sgarlato G.D. & Remington J.S. Two alleles of the gene encoding surface antigen P22 in 25 strains of *Toxoplasma gondii*. *The Journal of Parasitology*, 1994, 80, 293-301.

Potasman I., Araujo F.G., Desmonts G. & Remington J.S. Analysis of *Toxoplasma gondii* antigens recognized by human sera obtained before and after acute infection. *The Journal of Infectious Diseases*, 1986, 154, 650-657.

Velge-Roussel F., Moretto M., Buzoni-Gatel D., Dimier-Poisson I., Ferrer M., Hoebeke J. & Bout D. Differences in immunological response to a *T. gondii* protein (SAG1) derived peptide

between two strains of mice: effect on protection in *T. gondii* infection. *Molecular and Immunology*, 1997, 34, 1045-1053.

Human serum group	Number of serum tested	% (Number) of serum samples reacting with the following synthetic peptide		
		251-265/I	251-265/II-III	238-256/I
Positive adult serum	44	88.6% (39)	72.7% (32)	52.3% (23)
Positive children serum	67	94% (63)	92.5% (62)	56.7% (38)
Negative serum	40	0% (0)	2.5% (1)	2.5% (1)

Table I. ELISA reactivity of peptides with a panel of *Toxoplasma*-positive (44 acquired and 67 congenital toxoplasmosis) and *Toxoplasma*-negative human sera (40 sera without IgG, IgM and IgA anti-*Toxoplasma* antibodies).

Human serum sample	PCR-RFLP (SAG1/SAG2) Typing results	ELISA result			Ratio 251-265/I / 251-265/II-III
		251-265/I	251-265/II-III	238-256/I	
N°1	I	1.4	1.28	1.65	1.09
N°2	II	0.5	1.34	0.6	0.37
		0.97	1.69	1.5	0.57
N°3	II	1.78	2.54	1.15	0.70
		1.77	3.29	1.33	0.53
N°4	II	1.94	1.83	0.84	1.06
		1.89	2.36	0.65	0.8
		1.32	1.51	0.76	0.87
N°5	II	3.13	2.32	0.83	0.93
		3.4	3.63	1.65	1.34
		1.32	1.18	0.99	1.11
N°6	II	1.10	1.31	0.75	0.83
		1.79	1.81	1.77	0.98
N°7	II	0.66	1.41	0.8	0.46
		1.12	1.84	0.61	0.60
N°8	II	1.81	2.24	0.9	0.80
		1.19	1.47	1.2	0.80
N°9	II	0.74	1.31	1.01	0.56
		1.53	2.16	1.45	0.70
N°10	II	0.85	1	1.3	0.85
		0.56	1.55	0.56	0.36
N°11	II	0.86	1.07	0.78	0.80
		1.11	1.06	0.76	1.04
N°12	II	0.97	1.45	1.78	0.66
		2.48	4.8	2.43	0.51

The experiments were performed in duplicate and the average values were calculated. An IgG index was calculated for each test sample as follows: sample OD/0.4 (mean OD of the positive control - mean OD of the negative control). In order to determine positive sera, we added to average and three standard deviations. Clear cells, serum with positive reactivity; shaded cells, serum with negative reactivity.

Table II. Immunoreactivity of peptides with typed serum samples.

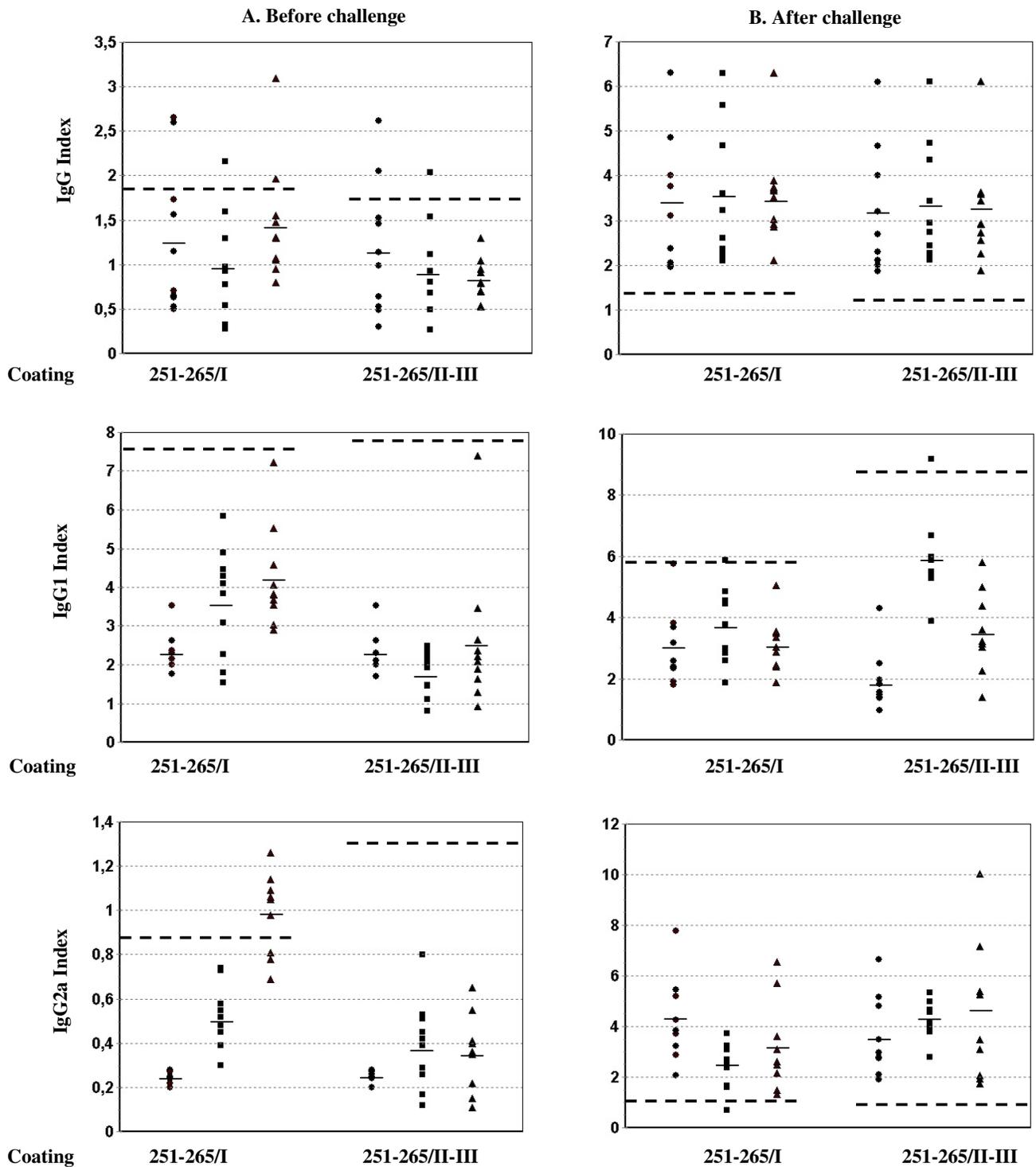


Fig. 1. Determination of IgG, IgG1 and IgG2a antibodies after three immunizations (A) and challenge (B) with live tachyzoites of PRU strain by ELISA. Control mice were challenged without immunization. Horizontal bars represent means of mice. The cut-off values are indicated by dotted lines. Mice immunised with ● 251-265/II-III, ■ 251-265/I, ▲ 238-256/I.

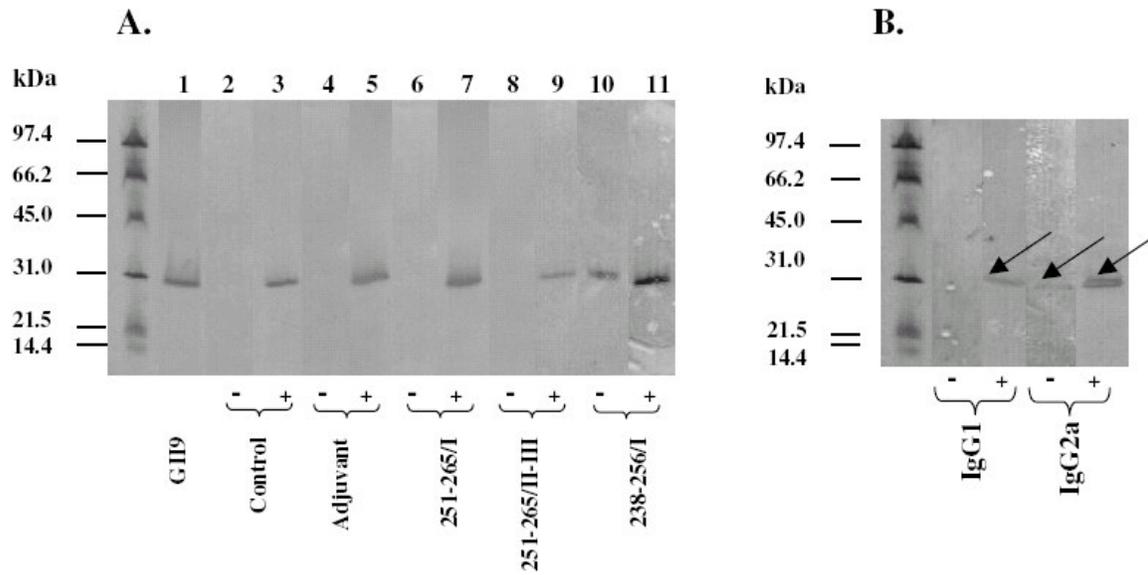


Fig. 2. Western Blotting of immunized mice sera, before (-) and after challenge (+), against *Toxoplasma gondii* sonicate antigen (TSA).

A. TSA probed with anti-mouse IgG. **Lane 1**, monoclonal **GII9**; **Lanes 2 and 3 (Control)**, sera without immunization; **Lanes 4 and 5 (adjuvant)**, sera from mice immunized with adjuvant; **Lanes 6 and 7 (251-265/I)**, sera from mice immunized with 251-265/I; **Lanes 8 and 9 (251-265/II-III)**, sera from mice immunized with 251-265/II-III; **Lanes 10 and 11 (238-256/I)**, sera from mice immunized with 238-256/I. **B.** TSA probed with anti-mouse IgG1 and IgG2a and serum of 238-256/I-immunized mice.

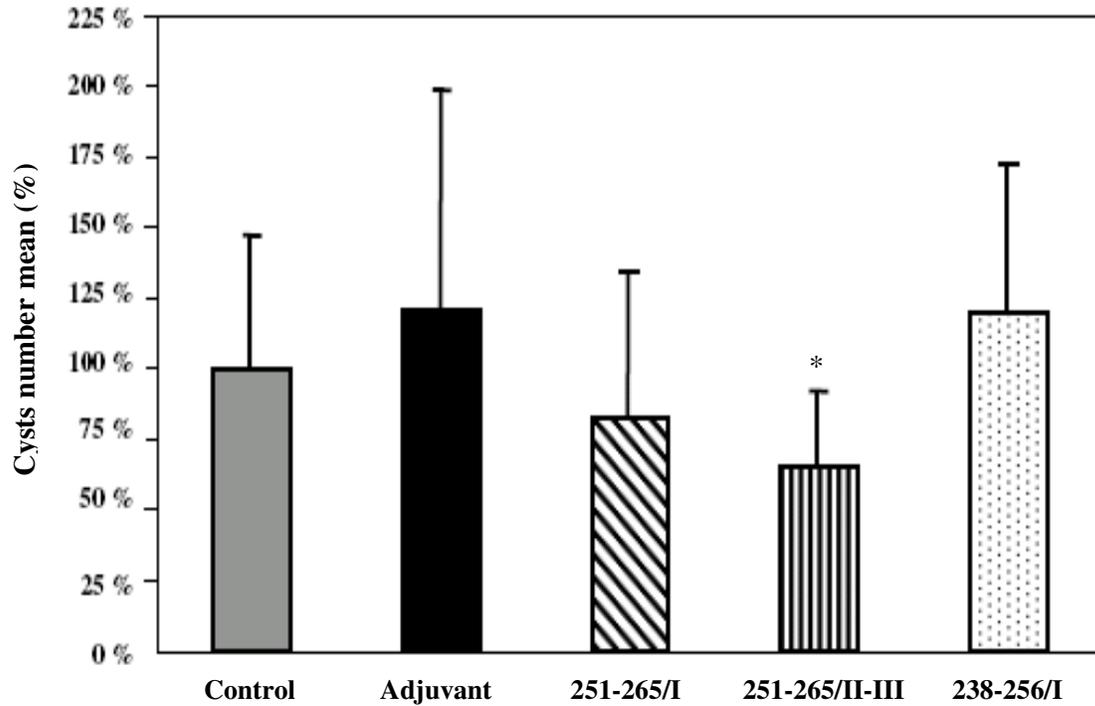


Fig. 3. Effect of immunization on cyst formation in mice infected with *T. gondii*.

Mice (n=10) were challenged intraperitoneally with 10^4 tachyzoites of the avirulent PRU strain. Cyst numbers were enumerated from whole brain homogenates. Results are expressed as the mean of cysts number per brain \pm standard deviation. (* $p < 0.05$). Results from one of two similar experiments are shown.

Annexe 3: Peptides derived from two different alleles of SAG1 discriminating type I from non-type I *Toxoplasma gondii* strains induce differential cytokine production by immature human dendritic cells.

Peptides derived from two different alleles of SAG-1 discriminating type I from non-type I *Toxoplasma gondii* strains induce differential cytokine production by immature human dendritic cells¹

Maggy Marle-Plistat,^{*,†} Dominique Aubert,[†] Thomas Baranek,^{*} Isabelle Villena,[†] Moncef Guenounou,^{*} Jean-Michel Pinon,[†] and Richard Le Naour^{2,*}

^{*} Laboratoire d'Immunologie, Virologie et Bactériologie, IPCM, EA 3796, IFR53, UFR de Pharmacie, Reims Cedex, France

[†] Laboratoire de Parasitologie, EA 3800, IFR53, UFR de Médecine, Reims Cedex, France

¹ This work was supported by a grant from the Region Champagne-Ardenne

² Address correspondence and reprint requests to Dr Richard Le Naour, Laboratoire d'Immunologie, Virologie et Bactériologie, IPCM, EA 3796, IFR53, UFR de Pharmacie, 1 rue du Maréchal Juin, 51096 Reims Cedex, France. E-mail address: richard.lenaour@univ-reims.fr

Abbreviations used in this paper : DC, dendritic cells; imDC, immature dendritic cells; SP, scrambled peptide; STge, soluble *T. gondii* extracts; TT, tetanus toxoid.

Running Title: SAG-1-derived peptides regulate human imDC cytokine production

Keywords: Antigen/Peptides/Epitopes, Cell Surface Molecules, Cytokines, Dendritic Cells
Parasitic-Protozoan

Abstract

Dendritic cell (DC) activation and maturation by *Toxoplasma gondii* is crucial for development of an effective immune response. DC are characterized by their ability to produce pro-inflammatory cytokines such as IL-12 which is important in toxoplasmosis to promote development of IFN- γ producing Th-1 cells. In murine model, *T. gondii* is found to be highly effective at invading immature DC (imDC), and SAG-1, the major surface antigen of *T. gondii*, is involved in the capacity of DC to produce IL-12, and of CD4⁺ T cells to induce a Th-1 immune response. We here investigated whether two peptides derived from two different allele of SAG-1 differentiating type I virulent strains (251-265/I peptide) from non-type I avirulent strains (251-265/II-III peptide) of *T. gondii* might exert differential regulatory role on human imDC functions. Using flow cytometry, RT-PCR and ELISA analysis we demonstrated that 251-265/I and 251-265/II-III peptides led to partial maturation of imDC associated with a differential IL-12, TNF- α , IL-6 and IL-10 production both at the mRNA and protein levels, suggesting a potential role of peptides for DC polarization. Furthermore, despite a weak capacity of peptides to induce a strong signal for CD4⁺ T lymphocyte proliferation, we evidenced that the IL-12/IL-10 balance induces in the microenvironment of imDC by 251-265/I and 251-265/II-III peptides plays a key role for the promotion of IFN- γ -producing Th-1 CD4⁺ T cells. Finally, our findings would suggest that 251-265/II-III peptide which is related to avirulent strains of *T. gondii* could participate to the development of Th-1 protective immune response.

Introduction

Toxoplasma gondii is an opportunistic intracellular protozoan parasite that causes asymptomatic infection in human immunocompetent hosts but severe pathology in immunocompromised patients (1) and in newborn with congenital toxoplasmosis (2). *T. gondii* comprises three clonal lineages classified according to their genotype and virulence phenotype in mice (3). The type I strains are highly lethal in murine infections and are responsible for acute toxoplasmosis (4), whereas type II and type III strains which are responsible for the majority of congenital or chronic toxoplasmosis (5) display lower virulence in mice.

It is well accepted that effective and protective immunity against *T. gondii* is mainly Th-1-cell mediated, and that early production of interleukin (IL)-12 promotes the development of IFN- γ -producing Th-1 cells for control of acute and chronic *T. gondii* infection (6-8). Dendritic cells (DC, professional antigen-presenting cells of immune response) are among the first cells to interact with *T. gondii* and to produce IL-12 independently or not of signals provided from T cells (9-11). When the presence of T cells is required, IL-12 induction in *T. gondii*-infected DC is maximal with autologous lymphocytes isolated from seropositive donors for *T. gondii* (10). *T. gondii* is found to be highly effective at invading immature DC (imDC) (12) and biological and functional properties of *T. gondii*-infected DC are dependent on parasite strain type and parasite biological form. DC maturation which is associated with production of pro-inflammatory cytokines such as IL-12 is triggered by virulent type I strains and not by type II strains (13). Moreover, live *T. gondii* failed to activate immature DC although heat-inactivated parasites and soluble *T. gondii* antigens activated them in maturation process (12).

The 30-kDa SAG-1 protein is the major immunodominant surface antigen of the invasive tachyzoite stage of *T. gondii* (14, 15). SAG-1 is highly conserved in *T. gondii* strains (16) and

various antigenic peptide constructs derived from the SAG1 protein have been shown to be partially protective in rat and mouse toxoplasmosis (17, 18). In the murine model, SAG-1 is involved in the development of a Th-1-like T cell response through induction of IFN- γ production by human T lymphocytes (19) and a SAG-1 null mutant has been described to affect the capacity of DC to produce IL-12, and of CD4⁺ T cells to elicit a pro-inflammatory Th-1 immune response (20).

The aim of the present study was to investigate the effects of two peptides derived from two different allele of SAG-1 differentiating type I virulent strains from type II and type III avirulent strains of *T. gondii* and identified as 251-265/I and 251-265/II-III on the regulation of human DC functions. Using immature monocyte-derived DC obtained from seropositive donors for *T. gondii*, we evidenced the critical role of 251-265/I and 251-265/II-III peptides both in maturation process and differential activation of the cytokine-producing capacity of these cells. In addition, we provide evidence that 251-265/II-III peptide which is related to avirulent strains of *T. gondii* has the unique capacity to activate imDC for the promotion of IFN- γ -producing Th-1 autologous CD4⁺ T cells.

Materials and methods

Reagents

Culture reagents and molecular biology products were from Invitrogen. All labeled monoclonal antibodies and flow cytometry products were purchased from BD PharMingen. Recombinant cytokines and growth factors were from R&D Systems. *E. Coli* LPS 0111:B4, brefeldin A, tetanus toxoid and mitomycin C were purchased from Sigma.

Selection and synthesis of peptide sequences

Nucleotide sequences for the surface antigen SAG-1 were obtained from GenBank for RH strain (accession number X14080) and by direct sequencing for the following eight *T. gondii* strains: type I (RH), type II (PRU, RMS-1999-BES and RMS-2000-TRA), type III (RMS-1997-PAR), atypical strains (RMS-2001-MAU, RUB and MAS). Nineteen polymorphic regions were identified after alignment of nucleotide SAG-1 sequences and two allele specific polymorphic peptides differentiating type I virulent strains (peptide 251-265/I, TENPWQGNASSDKGA) from type II and type III avirulent strains (peptide 251-265/II-III, SENPWQGNASSDNGA) of *T. gondii* were chosen according to predictive algorithm (program PEOPLE: Predictive Estimation Of Protein Linear Epitopes) allowing to define an epitope/antigenic index computed by combining different biophysical characteristics of residues such as secondary structure, hydrophilicity, surface accessibility and flexibility (21).

The 251-265/I, 251-265/II-III peptides and the scrambled peptide (SP, PNSADNEWGSGSNQA) were synthesized with an automated synthesizer (Perceptive Biosystems) by solid phase method using a Fmoc (*N*-(9-fluorenyl)methoxycarbonyl) derivative procedure and were purified further by reverse phase high performance liquid chromatography with a C18 column by elution with a gradient of acetonitrile in trifluoroacetic acid, and then lyophilized (22). Purity and composition of peptides were checked by Electron Spray Mass Spectrometry (Surveyor-MSQ, ThermoFinnigan). All Peptide preparations used

in experiments were free of detectable levels of endotoxin (< 0.015 EU/mL) as determined using a *Limulus* amoebocyte lysate test (E-TOXATE reagent, Sigma).

Isolation of human monocytes and CD4⁺ T lymphocytes

Human monocytes and lymphocytes were isolated from heparinized venous blood of healthy donors by countercurrent centrifugal elutriation under sterile and endotoxin-free conditions as previously described (23). CD4⁺ T cells were purified from lymphocyte fraction by positive selection using magnetic beads coated with a mouse monoclonal anti-CD4 antibody (Dynabeads, Dynal, France) according to the manufacturer's instructions. After selection, cells were cultured 24 h in RPMI-1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS) to allow bead detachment. Then, CD4⁺ T cells were stored frozen in liquid nitrogen until use for antigen presentation assay. For experiments, monocyte and CD4⁺ T lymphocyte enrichments were shown to be $> 98\%$ by FACS analysis (data not shown) and cell viability was in excess of 95% as determined by trypan blue exclusion. To determine whether human monocytes and CD4⁺ T lymphocytes were isolated from seropositive or seronegative healthy volunteers for anti-*T. gondii* IgG and IgM, serologic tests were performed by ELISA (Abbott laboratories, USA). In our study, all experiments were performed from cells isolated from seropositive donors for *T. gondii* IgG or IgM specific antibodies.

Generation of human monocyte-derived dendritic cells

Human immature DC (imDC) were induced by culturing purified peripheral blood monocytes (1×10^6 /ml) for 5 days under adherence-free conditions in Teflon wells (Merck, France) at 37°C in DC medium containing RPMI-1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated FCS, 300 µg/mL L-glutamine, 100 U/mL penicillin, 50 µg/mL streptomycin, 800 U/mL recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (rhGM-CSF)

and 500 U/mL recombinant human interleukin-4 (rhIL-4). Positive DC maturation was induced by culturing imDC for an additional 2 days in the presence of GM-CSF, IL-4 and 1 µg/ml *E. Coli* LPS.

Peptide stimulation of immature DC

Immature DC cultured under experimental conditions above indicated were harvested, washed, and seeded onto Teflon wells at 1×10^6 /ml in DC medium and cultured in the presence either of various concentrations of 251-265/I or 251-265/II-III peptides (0.01, 0.1, and 1 µg/mL), or 1 µg/mL *E. coli* LPS, or 50 µg/mL soluble *T. gondii* extracts (STge), or 1 µg/mL SP. 6 h following incubation at 37°C in 5% CO₂, cell culture supernatants were collected for cytokine analysis while 48 h incubated cells were recovered for phenotypic studies.

Detection of surface makers and intracytoplasmic cytokines

For the analysis of human monocyte-, DC- and CD4⁺ T lymphocyte-associated surface marker expression, fluorescein isothiocyanate (FITC) conjugated anti-human CD14 (clone M5E2, mouse IgG_{2a}, κ), FITC anti-CD3 (clone SK7, mouse IgG₁, κ), allophycocyanin (APC) anti-CD1a (clone HI149, mouse IgG₁, κ), rhodamin phycoerythrin (RPE) anti-CD4 (clone RPA-T4, mouse IgG₁, κ), RPE anti-CD80 (clone L307.4, mouse IgG₁, κ), RPE anti-CD83 (clone HB15e, mouse IgG₁, κ), and RPE anti-CD86 (clone IT2.2, mouse IgG_{2b}, κ) were used. For surface marker analysis of monocytes or imDC, 5×10^5 cells were triple-stained with anti-CD14, anti-CD1a and either anti-CD80, -CD83 or -CD86 for 30 min at 4°C in the dark to prevent fluorescence quenching. Cells were then washed three time with 3 ml phosphate buffer saline (PBS, pH 7.4; 0.5% BSA, 0.1% NaN₃). After last centrifugation (500 g for 5 min), the pellets were resuspended in 500 µl PBS with 1% paraformaldehyde (PFA), and stored at 4°C in dark until analysis. For intracellular analysis of cytokine expression by CD4⁺

T lymphocytes in co-culture with imDC (see below), 1×10^6 mixed cells were double-stained with anti-CD3 and anti-CD4 for 30 min at 4°C and incubated for 10 min with 500 µl permeabilization buffer. Cells were washed three times with PBS and incubated with 2.5 µg/mL APC anti-human IFN-γ (clone 4S.B3, mouse IgG₁, κ) or APC anti-IL-4 (clone MP4-25D2, rat IgG1) antibodies for 30 min. Finally, washed cell pellets were resuspended in 500 µl PBS containing 1% PFA, and stored in the dark at 4°C until analysis.

Optimal antibody concentrations were determined by preliminary experiments. Finally, each antibody was used at concentrations of 1 µg/mL. Isotype-matched controls were used to determine non-specific labeling.

Flow cytometry

For monocytes, DC and CD4⁺ T lymphocytes, a three-color flow cytometric analysis was performed with a BD FACScalibur™. Human monocytes and DC were gated based on forward and side light-scattering properties, and thereafter on the presence or absence of the surface marker C14 and CD1a to distinguish the two cell populations in the same sample (monocytes: CD14^{high} CD1a⁻, DC: CD14⁻ CD1a^{high}). In co-culture, CD4⁺ T lymphocytes were distinguished from DC by drawing a gate on CD3⁺CD4⁺ T cell events.

A minimum of 10,000 events was acquired and analysis done on a logarithmic scale using CellQUEST™ software (Becton-Dickinson Instruments).

RT-PCR analysis

RNA extraction was performed using phenol/chloroform extraction followed by ethanol precipitation. Precipitated RNA (0.4 µg) from each sample was reverse-transcribed with oligo-dT as the first-strand cDNA primer and Moloney Murine Leukaemia Virus Reverse Transcriptase (σM-MLV RT) superscript as previously described (24). Primer sequences for cytokines (IL-12, TNF-α, IL-6, IL-10) and for the internal control β-actin, were as follows:

IL-12 sense 5'-CCA AGA ACT TGC AGC TGA AG-3'; IL-12 antisense 5'-TGG GTC TAT TCC GTT GTG TC-3'; TNF- α sense 5'-ATG AGC ACT GAA AGC ATG ATC-3'; TNF- α antisense 5'-TCA CAG GGC AAT GAT CCC AAA GTA GAC CTG CCC-3'; IL-6 sense 5'-ATG AAC TCC TTC TCC ACA AGC-3'; IL-6 antisense 5'-CTA CAT TTG CCG AAG AGC CCT CAG GCT GGA CTG-3'; IL-10 sense 5'-ATC AAG GCG CAT GTG AAC TC-3'; IL-10 antisense 5'-AGA GCC CCA GAT CCG ATT TT-3'; β -actin sense 5'-TGC TAT CCA GGC TGT GCT AT-3'; β -actin antisense 5'-ATG GAG ATT GAA GGT AGT TT-3'. The reagents and the classical PCR conditions were previously optimized (24). The amplification profile involved denaturing at 94°C for 1 min, primer annealing at 58°C (IL-10, β -actin) or 62°C (IL-12, TNF- α , IL-6) for 1 min and extension at 72°C for 1 min, for a total 40 cycles.

The PCR products for IL-12 (product size, 350 bp), TNF- α (product size, 702 bp), IL-6 (product size, 639 bp), IL-10 (product size, 563 bp) were analyzed comparatively to the amount of the β -actin housekeeping gene (product size, 443 bp) detected in the same mRNA sample. The linearity of amplification for cytokine and β -actin cDNA was over 28-42 cycles and the linearity of amplification relative to cDNA dilutions was over 1/5-1/160 for TNF- α , and 1/10-1/160 for IL-12, IL-6, IL-10 and β -actin.

Determination of cytokine concentration

IL-12, TNF- α , IL-6, and IL-10 levels in cell culture supernatants of imDC were performed in duplicate using commercially available high-sensitivity enzyme-linked immunosorbent assay kit (Quantikine, R&D Systems, France) according to the manufacturer's instructions. The sensitivity of each ELISA kits was 3.7 pg.mL⁻¹, 4.4 pg.mL⁻¹, 0.70 pg.mL⁻¹ and 3.9 pg.mL⁻¹ for IL-12, TNF- α , IL-6 and IL-10 respectively.

Antigen presentation assay

Antigen presentation assays were performed as previously described (25). Briefly, imDC were seeded at $1 \times 10^3 - 1 \times 10^4$ cells per well of a 96-well plate in DC medium and pulsed for 48 h with 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 251-265/I or 251-265/II-III peptides. Tetanus toxoid (TT, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and E.Coli LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) were used as positive control and PBS as negative control as previously described (25). After the incubation period, medium was discarded and imDC were treated with 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ mitomycin C for 45 min at 37°C and washed extensively. Autologous CD4⁺ T lymphocytes ($1 \times 10^5/\text{well}$) were then added and co-cultured for 6 days. The last 16 h of incubation, 0.5 μCi [³H]thymidine was added to each well. Incorporation assays were performed in quadruplicate and the amount of radioactivity incorporated into CD4⁺ T lymphocyte DNA was counted on a liquid scintillation counter (Packard, Meriden, CT). Results were expressed as count per minute (cpm) values corrected for spontaneous incorporation of [³H]thymidine into CD4⁺ T cells.

Stimulation of CD4⁺ T lymphocytes for cytokine expression

imDC were seeded onto Teflon wells at $1 \times 10^6/\text{ml}$ in DC medium and treated or with 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 251-265/I or 251-265/II-III peptides for 6 h. After the incubation period, autologous CD4⁺ T lymphocytes ($1 \times 10^7/\text{teflon well}$) pre-treated during 1 h with 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ secretion inhibitor brefeldin A were added and co-cultured for 6 h. Mixed cells were then collected, washed and analyzed for intracellular expression of IFN- γ and IL-4 by CD4⁺ T cells. In some experiments, imDC were treated with 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ recombinant human anti-IL-10 or anti-IL-12 monoclonal antibodies at the time of peptide pulsing.

Statistical analysis

Statistical significance was assessed by Student's paired *t*-test and analysis of variance. *p* values of less than 0.05 were considered to be statistically significant.

Results

251-265/I and 251-265/II-III T. gondii peptides induce incomplete maturation of human immature dendritic cells

To investigate whether *T. gondii* peptides derived from SAG-1 antigen and identified as 251-265/I and 251-265/II-III were sufficient to induce DC maturation, human imDC were generated (see *Materials and Methods*) and stimulated with different peptide concentrations. *E.coli* LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) was used as known optimal DC maturation stimulus as previously reported (26, 27) and soluble *T. gondii* extracts (STge, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) on the basis of their involvement in DC maturation as recently described (12). After 2-day incubation, expression levels of DC maturation markers CD14, CD80, CD83, CD86 and CD1a were analyzed by FACS. Fig. 1 shows the results of a representative experiment obtained after treatment of imDC with 251-265/I and 251-265/II-III peptides at the concentration of 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and table 1 summarizes the results obtained from different donors with peptide concentrations ranging from 0.01 to 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Human DC generated after culturing purified monocytes ($\text{CD14}^{\text{high}} \text{CD80}^- \text{CD83}^- \text{CD86}^{\text{low}} \text{CD1a}^-$, Fig. 1A) with rhGM-CSF and rhIL-4 exhibit a phenotype characteristic of imDC (28), i.e. $\text{CD14}^- \text{CD80}^{\text{low}} \text{CD83}^{\text{low}} \text{CD86}^+ \text{CD1a}^{\text{high}}$ (Fig. 1B and Table I). LPS clearly favors phenotypic maturation of imDC (Fig. 1C and Table I) and strongly up-regulated the surface expression of CD80, CD83 and CD86 while CD14 and CD1a remained stable ($\text{CD14}^- \text{CD80}^{++} \text{CD83}^{\text{high}} \text{CD86}^{++} \text{CD1a}^{\text{high}}$). In contrast with LPS, scrambled peptide (SP) does not change level expression of maturation markers compared with untreated imDC (Fig. 1D and Table I). A comparable conversion pattern to that of LPS was found when imDC were treated with STge (Fig. 1E and Table I) with respect to the expression of CD14, CD80, CD86 and CD1a ($\text{CD14}^- \text{CD80}^{++} \text{CD86}^{++} \text{CD1a}^{\text{high}}$). However, unlike LPS, two distinct cell fractions expressing CD83 were detected after 2 days culture with STge (Fig. 1D). Phenotypical and statistical analysis revealed the presence of $47 \pm 4.6\%$ and $53 \pm 4.6\%$

CD83^{high} and CD83^{low} cells, respectively (Table I). Upon 2 days culture in the presence of 1 µg/mL 251-265/I or 251-265/II-III peptides, imDC up-regulated CD80, CD83, and CD1a expression whereas CD86 expression remained statistically stable (Fig. 2F, 2G and Table I). Peptide treatment also led to the appearance of two cell fractions expressing CD83, with only 59.6 ± 3.4% and 57.3 ± 4% of imDC treated with 251-265/I and 251-265/II-III becoming CD83^{high}, respectively (Table I). There was no significant difference between 251-265/I-activated/DC and 251-265/II-III-activated/DC with respect to the expression of CD80, CD83, CD86 and CD1a (p=0.05) both at 0.1 and 1 µg/mL peptide concentration (Table I). Moreover, 0.01 µg/mL peptide concentration was unable to modify the surface expression pattern of imDC. Of note, peptide-induced CD80 expression is not as marked as that induced by LPS or STge whereas CD83 is more expressed in peptide-induced CD83^{high} cell fractions.

251-265/I and 251-265/II-III T. gondii peptides induce differential cytokine production by human imDC

We next analyze the 251-265/I and 251-265/II-III peptides-mediated effects on human DC activation through cytokine production. IL-12, TNF-α, IL-6 and IL-10 synthesis was determined at the mRNA (RT-PCR) and protein (ELISA) levels prior and after peptides stimulation of imDC. *E.coli* LPS (1 µg/mL) which has been shown to be a potent inducer of cytokine production by DC (29), was used as a positive control. Fig. 2A illustrates the results of cytokine mRNA expression of a representative experiment and Fig. 2B shows the quantitative analysis of mRNA cytokine gene expression obtained from different donors. imDC spontaneously expressed a low but detectable mRNA level of IL-12 but no TNF-α, IL-6 and IL-10 (Fig. 2A, lane 1). SP is unable to change the cytokine mRNA expression profile (Fig. 2A, lane 2) whereas LPS highly up-regulated the levels of IL-12, TNF-α and IL-6 transcripts and, to a lesser extent, the amount of IL-10 mRNA, compared with untreated imDC (Fig. 2A, lane 9). Similar findings were found at the protein level by ELISA (Fig. 3A).

Compared to untreated imDC, the activation with increasing doses of 251-265/I peptide (0.01 to 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) resulted in a substantial and progressive increase of IL-12, TNF- α , and IL-10 mRNAs and a sharply augmentation of IL-6 transcripts leveled already at 10^{-2} pg/mL dose (Fig. 2A, lane 3-5 and Fig. 2B). However, unlike LPS, 251-265/I peptide activation of imDC induced more discrete increase in the levels of IL-12 and TNF- α mRNA whereas the signals for IL-6 and IL-10 are significantly more pronounced (Fig. 2A, lane 3-5 versus lane 9 and Fig. 2B). Regulation of cytokine mRNA expression by 251-265/I peptide was confirmed by ELISA (Fig. 3B). Conversely, imDC activated in the presence of 251-265/II-III peptide acquired the capacity to produce IL-12 and TNF- α transcript levels at similar level than that of LPS, even at concentrations as low as 10^{-2} pg/mL (Fig. 2A, lane 6-8 versus lane 9 and Fig. 2B). In sharp contrast with IL-12 and TNF- α , the levels of IL-6 and IL-10 transcripts were poorly increased by 251-265/II-III peptide compared with LPS (Fig. 2A, lane 6-8 versus lane 9 and Fig. 2B). Consistent with mRNA levels, the amount of IL-12 and TNF- α detected in cell culture supernatants of imDC treated with 251-265/II-III peptide was significantly higher than that of IL-6 (Fig. 3B). Surprisingly, regulation of IL-10 mRNA expression by 251-265/II-III peptide was not confirmed at the protein level since IL-10 could not be detected by ELISA (Fig. 3B).

imDC pulsed with 251-265/I or 251-265/II-III T. gondii peptides fail to induce fully T cell proliferation

Since 251-265/I and 251-265/II-III *T. gondii* peptides have a potential effect, even if incomplete, on co-stimulatory/maturation markers expression by imDC, we next investigated whether such regulation might correlate with the capacity of 251-265/I- and 251-265/II-III-pulsed DC to induce T cell proliferation. To this aim, an antigen presentation assay was performed (see *Materials and Methods*) to compare the antigen-presenting capacity of imDC pulsed with 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 251-265/I or 251-265/II-III peptides with that obtained in the presence

of 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ tetanus toxoid (TT) or 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ *E.Coli* LPS as previously described (25). As illustrated in Fig. 4, pulse of imDC with TT and LPS led to a significant and comparable increase of the proliferation of autologous CD4^+ T cells, demonstrating antigen presentation by DC. When imDC were pulsed with 251-265/I or 251-265/II-III, a significant (compared with PBS pulsed DC) but moderate increase of T cell proliferation was observed compared with TT- or LPS-pulsed imDC (Fig. 4). Augmentation of the proliferation index of T cells was comparable between imDC pulsed with 251-265/I or 251-265/II-III.

IL-12 production by 251-265/I or 251-265/II-III-treated imDC increase IFN- γ production by CD4^+ T cells

To analyse whether cytokine pattern production of peptide-treated imDC was involved on the immunomodulatory properties of human T cells, intracellular Th-1 (IFN- γ) and Th-2 (IL-4) cytokine expression was determined by flow cytometry analysis 6 h following imDC/ CD4^+ T cells co-culture. CD4^+ T lymphocytes were distinguished from DC by drawing a gate on $\text{CD3}^+\text{CD4}^+$ T cell events. CD4^+ T cells co-cultured with untreated-imDC expressed detectable basal levels of IFN- γ and IL-4 (Fig. 5A and 5B, green curves). Co-culture with 251-265/I-treated imDC did not significantly change IFN- γ and IL-4 levels in CD4^+ T cells (Fig. 5A, red curves versus green curves) whereas 251-265/II-III-treated imDC up-regulate IFN- γ expression without effect on IL-4 level (Fig. 5B, red curves versus green curves). In setting with our former results (Fig. 3), imDC were co-treated with anti-IL-10 or anti-IL-12 monoclonal antibodies at the time of treatment with 251-265/I or 251-265/II-III, respectively. Activation of CD4^+ T cells results in an increase IFN- γ expression when co-culture was performed using imDC concomitantly treated with 251-265/I and anti-IL-10 (Fig. 5C, red curve versus green curve). In contrast, anti-IL-12- and 251-265/II-III-treated imDC were unable to induce IFN- γ production by T cells (Fig. 5D, red curve versus green curve).

Discussion

We initially hypothesized that peptides derived from two different allele of SAG-1 differentiating type I virulent strains from type II and type III avirulent strains of *T. gondii* might contribute to a differential regulation of human imDC functions. In this setting, we found that 251-265/I and 251-265/II-III peptides led to partial maturation associated with activation of human imDC. Peptide-initiated maturation was determined by up-regulation of CD80 co-stimulatory molecules and CD83 maturation marker. However, 251-265/I and 251-265/II-III were unable to induce full maturation of DC as after 48 hr of treatment less than 60% of DC highly expressed CD83 and CD86 expression remained statistically unchanged. *T. gondii* has been shown to invade human imDC with incomplete activation or lack of activation of them in a maturation process (11, 30, 31), and soluble *T. gondii* extracts have been most recently described to stimulate notable murine DC maturation (12). However, to our knowledge this is the first report demonstrating that peptides derived from SAG-1 antigen of *T. gondii* can participate to DC maturation. Of note, the two peptide used in this study showed no differences in their ability to induce partial DC maturation. Recently, authors have demonstrated that human DC maturation was observed only by type I strain infection whereas a soluble factor released by type II strain was responsible of the absence of DC maturation (13). Our findings provide evidence that, independently of soluble inhibitory factors secreted by structurally intact *T. gondii*, SAG-1 derived peptides discriminating type I from non-type I strains of *T. gondii* contribute equally to human DC maturation.

In keeping with a maturation process, activation of imDC was shown by induction of pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-6), IL-12 and IL-10. Activation by 251-265/I peptide induced comparable or higher amounts than *E. Coli* LPS, except for IL-12 and TNF- α , which were induced in significantly lower amounts. In contrast, while IL-12 and TNF- α production by 251-265/II-III was comparable with *E. Coli* LPS, IL-6 and IL-10 were weakly produced.

Furthermore, the two allelic peptides used in this study induced a differential cytokine production in the local microenvironment of imDC. Overall, our data add further insight into the adaptation of myeloid DC function to the environmental conditions encountered at the site of the induction of their maturation as previously described (32, 33). Several type 1 and type 2 DC-polarizing factors including viral and bacterial products have been identified, which can respectively enhance (34-37) or inhibit (38-40) the IL-12-producing capacity of DC. Here, we showed that two allelic peptides of *T. gondii* SAG-1 antigen exposure of imDC induced differential IL-12, but also TNF- α , IL-6 and IL-10 production, suggesting a potential role for DC polarization. Indeed, 251-265/I peptide seems preferentially contribute to the development of type-2 polarized DC through the predominant production of IL-6 and IL-10 compared with 251-265/II-III peptide which appears to be most effective to drive the development of DC into IL-12- and TNF- α -dependent type-1 polarization. Nevertheless, one might also consider that 251-265/I peptide sufficiently increased IL-12 level following DC activation to provide convincing evidence that 251-265/I influence on DC function might depend on the delicate balance between type 1 and type 2 cytokine secretion in their local environment.

Production of IL-12 by DC is of major importance in the Th-1 orientation of the T cell immune response (41, 42), whereas secretion of IL-10, known to inhibit bioactive IL-12 production by DC (43), favors Th-2 polarization. Our findings are in accordance with these observations. We showed that 251-265/I-treated imDC inability to direct CD4⁺ T lymphocytes toward an intracellular IFN- γ or IL-4 expression was nonetheless effective when imDC were co-treated with anti-IL-10 antibody displaying then a Th-1 promoting capacity through the up-regulation of IFN- γ level in CD4⁺ T cells. Given that inhibition of IL-10 production in 251-265/I-treated imDC promotes Th-1 immune response, it was attempting to speculate that IL-10 could antagonize bioactive IL-12 production by 251-265/I-treated imDC.

This hypothesis was confirmed by the promotion of IFN- γ -producing Th-1 CD4⁺ T cells by 251-265/II-III-treated imDC, the IL-10 secretion being undetectable in these experimental conditions. Strikingly, anti-IL-12 antibodies were shown to reverse the Th-1 profile induced by 251-265/II-III-treated imDC. The physiopathological relevance of SAG-1 derived peptide-mediated T helper orientation of the T cell response might be correlated with the virulence parameters of *T. gondii* strains. To that respect, the 251-265/II-III peptide which is related to type II and type III avirulent strains of *T. gondii* could probably display beneficial effects (through IL-12 induction by DC) for the development of Th-1 response known to mediate protective immunity (6-8) while 251-265/I peptide which is related to type I virulent strains could not. Importantly, IL-10 secretion by imDC might act as a key cytokine in virulence of *T. gondii* strains, although Wille *et al.* reported that IL-10 does not contribute to the pathogenesis of the virulent strain RH (44).

However, it needs to be considered that 251-265/I and 251-265/II-III peptides do not constitute strong signals to induce CD4⁺ T lymphocyte proliferation, reflecting a moderate intrinsic capacity to modulate T cell response during antigen presentation process. The weak proliferative response might be explained by the incomplete peptide-mediated DC maturation which is crucial to make DC potent activators of T lymphocyte growth (45, 46) and by the cytokine pattern in the DC microenvironment. TNF- α which production is both induced by 251-265/I- and 251-265/II-III-treated DC leads to a decrease of DC capacity to stimulate CD4 lymphocyte proliferation (28). As a whole, our data further illustrate the critical role of polymorphic peptides derived from *T. gondii* SAG-1 antigen in the orientation of T cell immune response through induction of cytokine production by imDC, and provide convincing evidence that physiopathological evolution of *T. gondii* infection depends on the cytokine polarization of DC.

Acknowledgments

The authors would like to thank Pr P. Nguyen and the Etablissement de Transfusion Sanguine Nord-Est (France) for providing the monocyte and lymphocyte samples, and Pr J. Y. Laronze for synthesis of *T.gondii* and scrambled peptides .

References

1. Luft, B. J., and J. S. Remington. 1992. Toxoplasmic encephalitis in AIDS. *Clin. Infect. Dis.* 15:211.
2. Remington, J. S., R. McLeod, P. Thulliez, and G. Desmonts. 2001. Toxoplasmosis. In *Infectious diseases of the fetus and newborn infant*. J. S. Remington and J. O. Klein, eds. Saunders, Philadelphia, p.205.
3. Howe, D. K., and L. D. Sibley. 1995. Toxoplasma gondii comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *J. Infect. Dis.* 172:1561.
4. Sibley, L. D., and J. C. Boothroyd. 1992. Virulent strains of Toxoplasma gondii comprise a single clonal lineage. *Nature* 359:82.
5. Ajzenberg, D., N. Cogne, L. Paris, M.H. Bessieres, P. Thulliez, D. Filisetti, H. Pelloux, P. Marty, M. L. Darde. 2002. Genotype of 86 Toxoplasma gondii isolates associated with human congenital toxoplasmosis, and correlation with clinical findings. *J. Infect. Dis.* 5:684.
6. Gazzinelli, R. T., M. Wysocka, S. Hayashi, E. Y. Denkers, S. Hieny, P. Caspar, G. Trinchieri, A. Sher. 1994. Parasite-induced IL-12 stimulates early IFN-gamma synthesis and resistance during acute infection with Toxoplasma gondii. *J. Immunol.* 6:2533.
7. Hunter, C. A., E. Candolfi, C. Subauste, V. Van Cleave, J. S. Remington. 1995. Studies on the role of interleukin-12 in acute murine toxoplasmosis. *Immunology* 1:16.
8. Yap, G. M. Pesin, A. Sher. 2000. Cutting edge: IL-12 is required for the maintenance of IFN-gamma production in T cells mediating chronic resistance to the intracellular pathogen, Toxoplasma gondii. *J. Immunol.* 2:628
9. Reis e Sousa, C., S. Hieny, T. Schariton-Kersten, D. Jankovic, H. Charest, R. N. Germain, A. Sher. 1997. In vivo microbial stimulation induces rapid CD40 ligand-independent production of interleukin 12 by dendritic cells and their redistribution to T cell areas. *J. Exp. Med.* 11:1819.

10. Seguin, R., L. H. Kasper. 1999. Sensitized lymphocytes and CD40 ligation augment interleukin-12 production by human dendritic cells in response to *Toxoplasma gondii*. *J. Infect. Dis.* 2:467.
11. Subauste, C. S., M. Wessendarp. 2000. Human dendritic cells discriminate between viable and killed *Toxoplasma gondii* tachyzoites: dendritic cell activation after infection with viable parasites results in CD28 and CD40 ligand signaling that controls IL-12-dependent and -independent T cell production of IFN-gamma. *J. Immunol.* 3:1498.
12. McKee, A. S., Dzierszynski F., Boes M., Roos D. S., Pearce E. J. 2004. Functional inactivation of immature dendritic cells by the intracellular parasite *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* 4:2632.
13. Diana, J., Persat F., Staquet M. J., Assossou O., Ferrandiz J., Gariazzo M. J., Peyron F., Picot S., Schmitt D., Vincent C. 2004. Migration and maturation of human dendritic cells infected with *Toxoplasma gondii* depend on parasite strain type. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 3:321.
14. Kasper, L. H., J. H. Crabb, and E. R. Pfefferkorn. 1983. Purification of a major membrane protein of *Toxoplasma gondii* by immunoadsorption with a monoclonal antibody. *J. Immunol.* 130:2407.
15. Burg, J. L., D. Perelman, L. H. Kasper, P. L. Ware, and J. C. Boothroyd. 1988. Molecular analysis of the gene encoding the major surface antigen of *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* 141:3584.
16. Windeck, T., and U. Gross. 1996. *Toxoplasma gondii* strain-specific transcript levels of SAG1 and their association with virulence. *Parasitol. Res.* 82:715.

17. Darcy, F., P. Maes, H. Gras-Masse, C. Auriault, M. Bossus, D. Deslee, I. Godard, M. F. Cesbron, A. Tartar, and A. Capron. 1992. Protection of mice and nude rats against toxoplasmosis by multiple antigenic peptide construction derived from *Toxoplasma gondii* P30 antigen. *J. Immunol.* 149:2636.
18. Letscher-Bru, V., A. W. Pfaff, A. Abou-Bacar, D. Filisetti, E. Antoni, O. Villard, J. P. Klein, E. Candolfi. 2003. Vaccination with *Toxoplasma gondii* SAG-1 protein is protective against congenital toxoplasmosis in BALB/c mice but not in CBA/J mice. *Infect. Immun.* 11:6615.
19. Khan, I. A., M. E. Eckel, E. R. Pfefferkorn, L. H. Kasper. 1988. Production of gamma interferon by cultured human lymphocytes stimulated with a purified membrane protein (P30) from *Toxoplasma gondii*. *J. Infect. Dis.* 5:979.
20. Rachinel, N., D. Buzoni-Gatel, C. Dutta, F. J. Mennechet, S. Luangsay, L. A. Minns, M. E. Grigg, S. Tomavo, J. C. Boothroyd, L. H. Kasper. 2004. The induction of acute ileitis by a single microbial antigen of *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* 4:2725.
21. Alix, A. J. P. 2000. Predictive estimation of protein linear epitopes by using the program PEOPLE. *Vaccine* 18:311.
22. Bouifraden, S., C. Drouot, M. el Hadrami, F. Guenoun, L. Lecointe, N. Mai, M. Paris, C. Pothion, M. Sadoune, B. Sauvagnat, M. Amblard, J. L. Aubagnac, M. Calmes, P. Chevallet, J. Daunis, C. Enjalbal, J. A. Fehrentz, F. Lamaty, J. P. Lavergne, R. Lazaro, V. Rolland, M. L. Roumestant, P. Viallefont, Y. Vidal, J. Martinez. 1999. Some of the amino acid chemistry going on in the Laboratory of Amino Acids, Peptides and Proteins, *Amino Acids* 16:345.
23. Broussas, M., P. Cornillet-Lefebvre, J. Bernard, J. C. Adjizian, G. Potron, P. Nguyen. 2000. Separation of dendritic cells from highly purified human monocytes by counterflow centrifugation induces tissue factor expression. *Transfusion* 9:1088.

24. Esnault, S., N. Benbernou, F. Lavaud, H. C. Shin, G. Potron, M. Guenounou. 1996. Differential spontaneous expression of mRNA for IL-4, IL-10, IL-13, IL-2 and interferon-gamma (IFN-gamma) in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from atopic patients. *Clin Exp Immunol* 103:111.
25. Viadal, V., J. Dewulf, G. M. Bahr. 2001. Enhanced maturation and functional capacity of monocyte-derived immature dendritic cells. *Immunology*, 103:479.
26. Sallusto, F., M. Cella, C. Danieli, A. Lanzavecchia. 1995. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J. Exp. Med.* 182:389.
27. Zhou, L. J., T. F. Tedder. 1996. CD14⁺ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83⁺ dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:2588.
28. Sallusto, F., A. Lanzavecchia. 1994. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumour necrosis factor alpha. *J. Exp. Med.* 179:1109.
29. Jiang, H. R., E. Muckersie, M. Robertson, H. Xu, J. Liversidge, J. V. Forrester. 2002. Secretion of interleukin-10 or interleukin-12 by LPS-activated dendritic cells is critically dependent on time of stimulus relative to initiation of purified DC culture. *J. Leuk. Biol.* 72:978.
30. Giese, A., S. Stuhlsatz, W. Daubener, C. R. MacKenzie. 2004. Inhibition of the growth of *Toxoplasma gondii* in immature human dendritic cells is dependent on the expression of TNF-alpha receptor 2. *J. Immunol.* 5:3366.

31. Wei, S., F. Marches, J. Borvak, W. Zou, J. Channon, M. White, J. Radke, M. Cesbron-Delauw, T. J. 2002. Curiel. Toxoplasma gondii-infected human myeloid dendritic cells induce T-lymphocyte dysfunction and contact-dependent apoptosis. *Infection and Immunity*, 70:1750.
32. Kalinski, P., C. M. U Hilkens, E. A. Wierenga, M. L. Kapsenberg. 1999. T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal. *Immunol. today*, 12:561.
33. Vieira, P. L., E. C. de Jong, E. A. Wierenga, M. L. Kapsenberg, P. Kalinski. 2000. Development of Th-1-inducing capacity in myeloid dendritic cells requires environmental instruction. *J. Immunol.* 164:4507.
34. Biron, C. A. 1997. Activation and function of natural killer cells responses during viral infections. *Curr. Opin. Immunol.* 9:24.
35. Hilkens, C. M. U., P. Kalinski, M. de Boer, M. L. Kapsenberg. 1997. Human dendritic cells require exogenous interleukin-12-inducing factors to direct the development of naive T-helper cells toward the Th-1 phenotype. *Blood* 90:1920.
36. Verhasselt, V., C. Buelens, F. Willems, D. de Groote, N. Haeffner-Cavaillon, M. Goldman. 1997. Bacterial lipopolysaccharide stimulates the production of cytokines and the expression of costimulatory molecules by human peripheral blood dendritic cells: evidence for a soluble CD14-dependent pathway. *J. Immunol.* 158:2919.
37. Cella, M., M. Salio, Y. Sakakibara, H. Langen, I. Julkunen, A. Lanzavecchia. 1999. Maturation, activation, and protection of dendritic cells induced by double-stranded RNA. *J. Exp. Med.* 189:821.
38. Panina-Bordignon, P., D. Mazzeo, P. D. Lucia, D. D'Ambrosio, R. lang, L. Fabbri, C. Self, F. Sinigaglia. 1997. β_2 -agonists prevent Th1 development by selective inhibition of interleukin 12. *J. Clin. Invest.* 100:1513.

39. Kalinski, P., J. H. N. Schuitemaker, C. M. U Hilkens, M. L. Kapsenberg. 1998. Prostaglandin E₂ induces the final maturation of IL-12-deficient CD1a⁺CD83⁺ dendritic cells: the levels of IL-12 are determined during the final dendritic cell maturation and are resistant to further modulation. *J. Immunol.* 161:2804.
40. van der Pijl, A. M. A., T. C. T. M., A. Snijders, L. C. Boeije, E. R de Groot, A. E Alewijnse, R. Leurs, L. A. Aarden. 1998. Histamine inhibits the production of interleukin-12 through interaction with H₂ receptors. *J. Clin. Invest.* 102:1866.
41. Mosmann, T. R., S. Sad. 1996. The expanding universe of T-cell subsets: Th-1, Th2 and more. *Immunol. Today* 17:138.
42. O'Garra, A. 1998. cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets. *Immunity* 8:275.
43. Corinti, S., C. Albanesi, A. La Sala, S. Pastore, G. Girolomoni. 2001. Regulatory activity of autocrine IL-10 on dendritic cell functions. *J. Immunol.* 166:4312.
44. Wille, U., E. N. Villegas, B. Striepen, D. S. Roos, C. A. Huenter. 1991. Interleukin-10 does not contribute to the pathogenesis of a virulent strain of *Toxoplasma gondii*. *Parasite Immunol.* 23:291.
45. Lutz, M. B., G. Schuler. 2002. Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? *Trends Immunol.* 23:445.
46. Moser, M. 2003. Dendritic cells in immunity and tolerance: do they display opposite functions? *Immunity* 19:5.

Figure legends

Figure 1. 251-265/I and 251-265/II-III *T. gondii* peptides induce partial phenotypic maturation of imDC. Human monocytes (A) were isolated by countercurrent centrifugal elutriation and cultured 5 days in the presence of recombinant human GM-CSF (800 U/mL) and IL-4 (500 U/mL) to obtain imDC (B). imDC maturation following 48 h treatment with *E. Coli* LPS (1 µg/mL, positive control, C), scrambled peptide (1 µg/mL, D), soluble *T. gondii* extracts (50 µg/mL, E), 251-265/I *T. gondii* peptide (1 µg/mL, F), or 251-265/II-III *T. gondii* peptide (1 µg/mL, G) was assessed by analysis surface expression of CD14, CD80, CD83, CD86 and CD1a by flow cytometry. Green histograms represent specific and purple histograms isotype-matched control antibodies. The peak channel of fluorescence intensity of green histograms was reported in each representation. Peak channel values between 1-5, 5.1-30, 31-100, 101-400, or >400 correspond to a negative, low, +, ++, or high expression level, respectively. Data shown are from one representative experiment out of five independent experiments.

Figure 2. Differential regulation of cytokine mRNA expression by 251-265/I and 251-265/II-III *T. gondii* peptides in imDC. A, Whole cell lysates from imDC exposed (6 h) or not (CT, negative control, lane 1) to scrambled peptide (SP, 1 µg/mL, lane 2), 251-265/I *T. gondii* peptide (lane 3-5), 251-265/II-III *T. gondii* peptide (lane 6-8), or *E. Coli* LPS (1 µg/mL, lane 9) were treated for RNA extraction and reverse-transcription. cDNA products were amplified using specific primers for β-actin, IL-12, TNF-α, IL-6 and IL-10 and intensity of ethidium bromide-stained cDNA bands analyzed under U.V. light. Data shown are from one representative experiment out of three independent experiments. B, Quantitative analysis of mRNA cytokine gene expression. Densitometric analysis of each lane was performed with Visilog 4 software (Noesis, France), and all values are expressed relative to β-actin

housekeeping gene transcripts. The results represent the mean \pm SD of the data of three independent experiments. Differences in cytokine mRNA expression between untreated (CT) and LPS-, SP-, 251-265/I- or 251-265/II-III-treated imDC were statistically significant ($p < 0.05$) excepted when NS (non significant) was reported in graphic representation. *differences in cytokine mRNA expression between 251-265/I- or 251-265/II-III-treated imDC and LPS-treated imDC used as control value is significant with $p < 0.05$.

Figure 3. Differential regulation of cytokine secretion by 251-265/I and 251-265/II-III *T. gondii* peptides in imDC. A, Profile of IL-12, TNF- α , IL-6 and IL-10 released over a period of 6 h in culture supernatants of imDC treated or not (CT, negative control) with 1 μ g/mL *E. Coli* LPS or scrambled peptide (SP). B, Profile of IL-12, TNF- α , IL-6 and IL-10 released in culture supernatants following 6h treatment of imDC with various concentrations (10^{-2} , 10^{-1} and 1 μ g/mL) of 251-265/I or 251-265/II-III *T. gondii* peptides. Profile of cytokine secretion was analyzed by specific ELISA kits according to the manufacturer's instructions. The results represent the mean \pm SD of the data of three independent experiments. Differences in cytokine secretion between untreated (CT) and LPS-, SP-, 251-265/I- or 251-265/II-III-treated imDC were statistically significant ($p < 0.05$) excepted when NS (non significant) was reported in graphic representation. ND: not detected.

Figure 4. 251-265/I- and 251-265/II-III-pulsed imDC induce moderate CD4⁺ T cells proliferation. imDC were pulsed or not (PBS, negative control) with 10 μ g/mL TT, 1 μ g/mL *E. Coli* LPS, or 1 μ g/mL 251-265/I or 251-265/II-III *T. gondii* peptides. 48 h later, imDC were washed and autologous CD4⁺ T lymphocytes were added. Cells were co-cultured for 6 days and were pulsed with [³H]thymidine for the last 16 h. The results represent the mean cpm \pm SD of the results of three independent experiments performed in quadruplicate. * $p < 0.05$ when compared with the control value (PBS pulsed imDC).

Figure 5. 251-265/I- and 251-265/II-III-treated imDC regulate IFN- γ expression by CD4⁺ T cells. imDC were treated or not with 1 μ g/mL 251-265/I or 251-265/II-III *T. gondii* peptides in the presence or not of 5 μ g/mL anti-IL10 or anti-IL-12 antibodies. 6 h later, autologous CD4⁺ T lymphocytes were added and co-cultured for 6 h. Mixed cells were then collected, washed and analyzed for intracellular expression of IFN- γ and IL-4 by CD4⁺ T cells. A and B, intracellular cytokine expression using imDC treated with 251-265/I or 251-265/II-III peptides, respectively. C and D, intracellular cytokine expression using imDC co-treated with 251-265/I and anti-IL-10 or 251-265/II-III and anti-IL-12, respectively. Purple histograms represent isotype-matched control, green histograms untreated imDC and red histograms treated (A and B) or co-treated (C and D) imDC. Data shown are from one representative experiment out of three independent experiments.

Figure 1

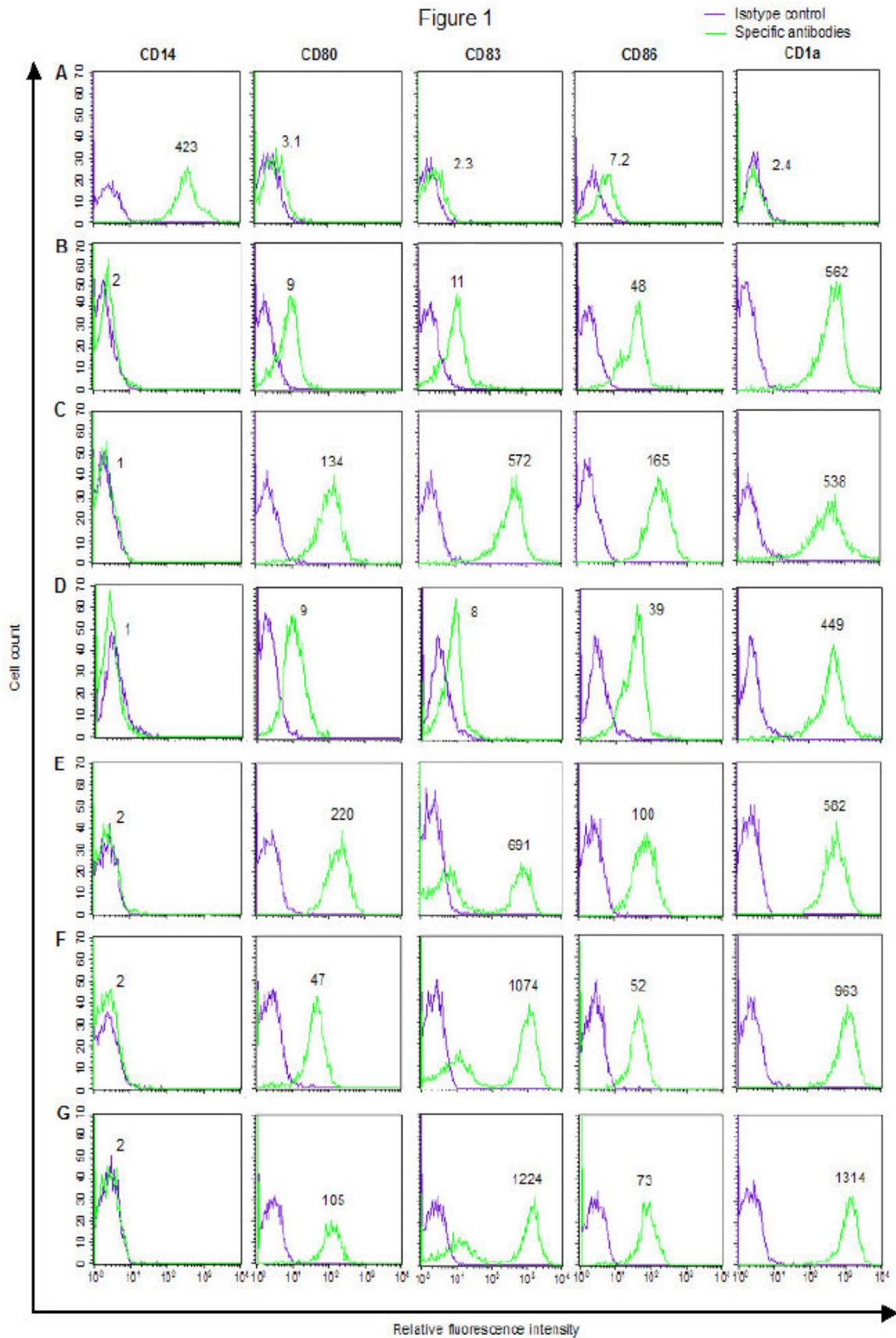
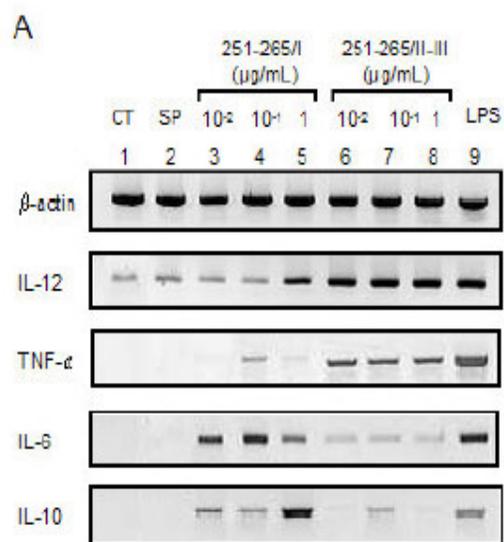


Figure 2



B

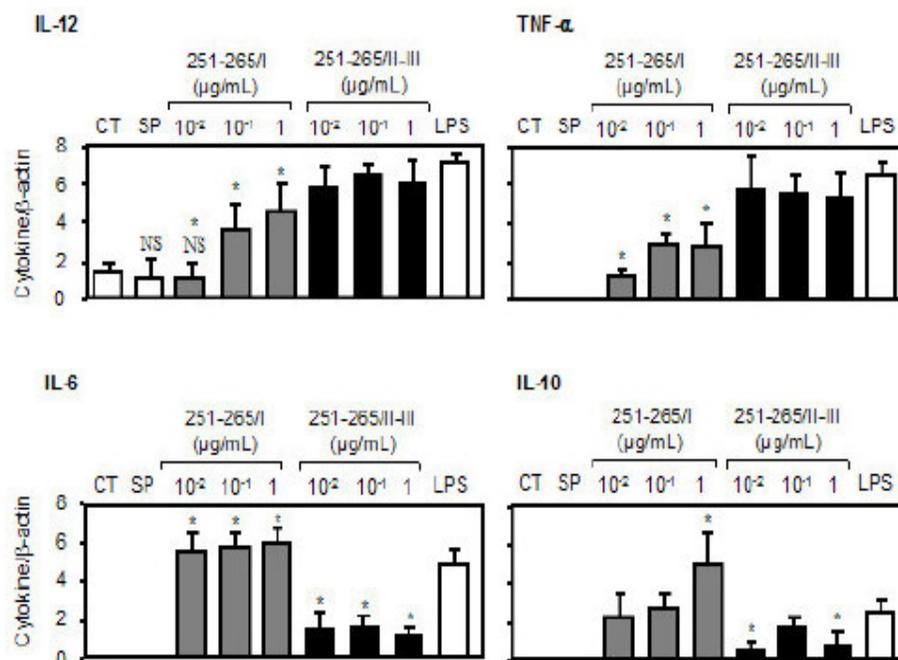


Figure 3

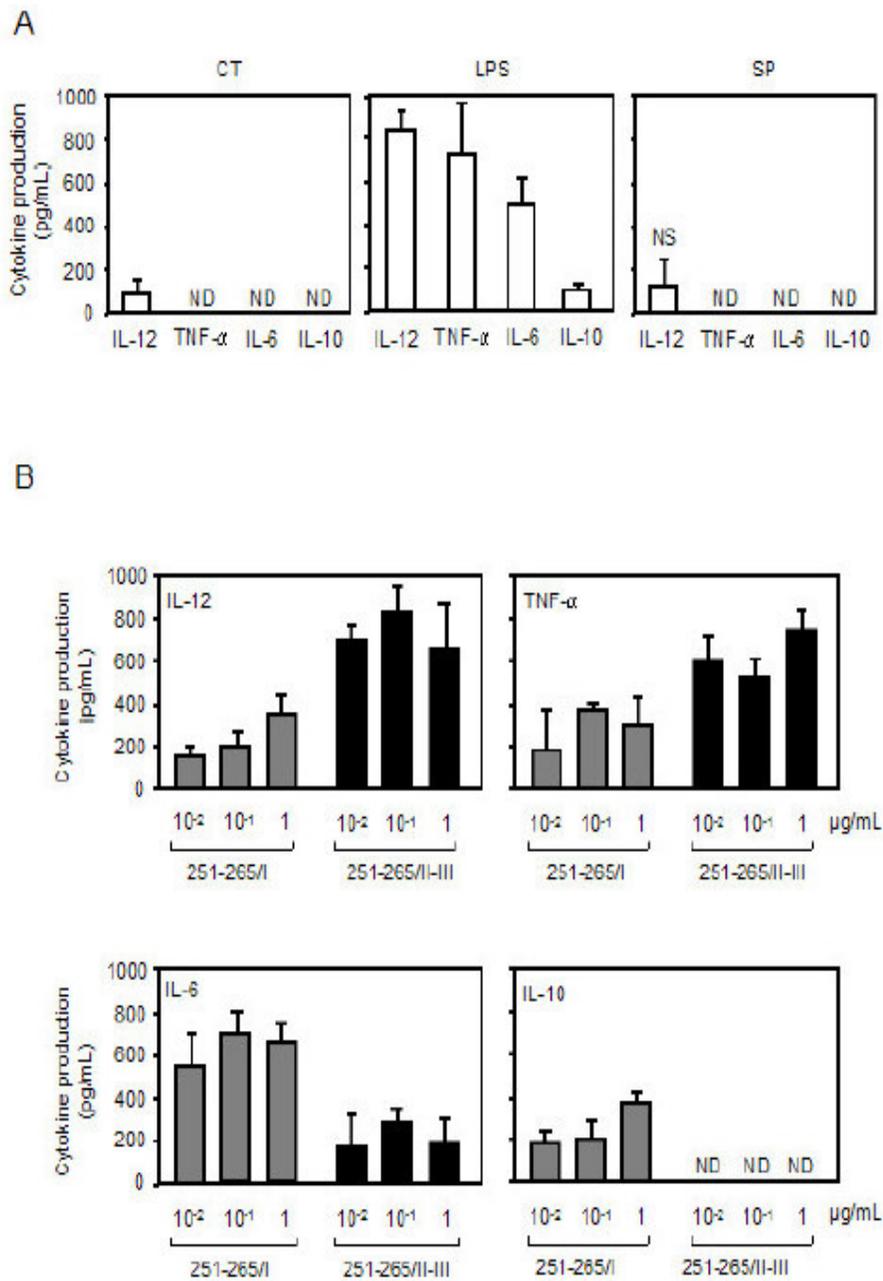


Figure 4

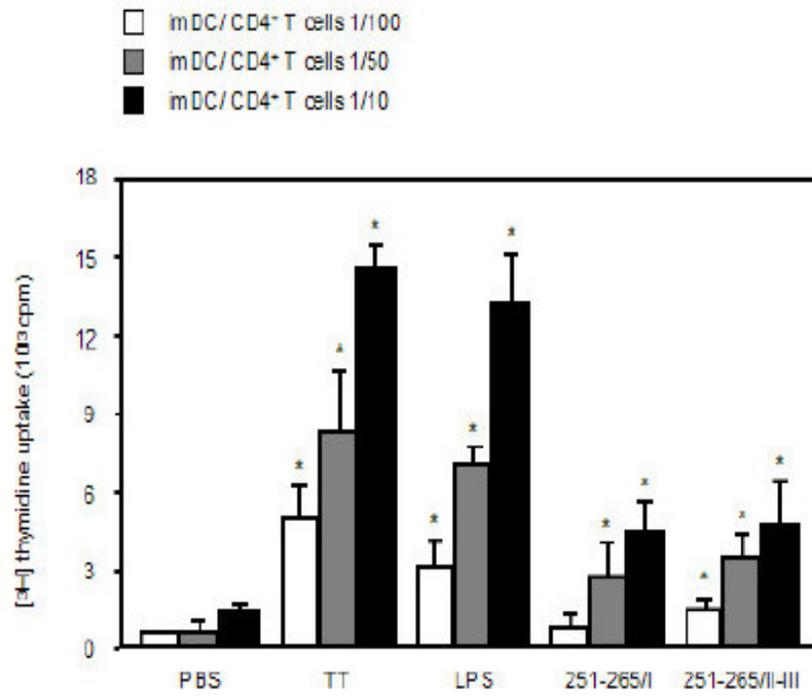
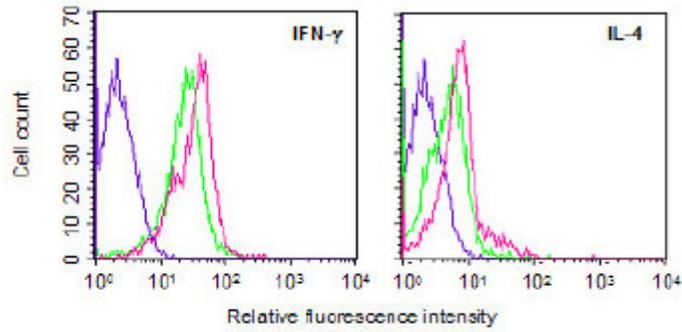


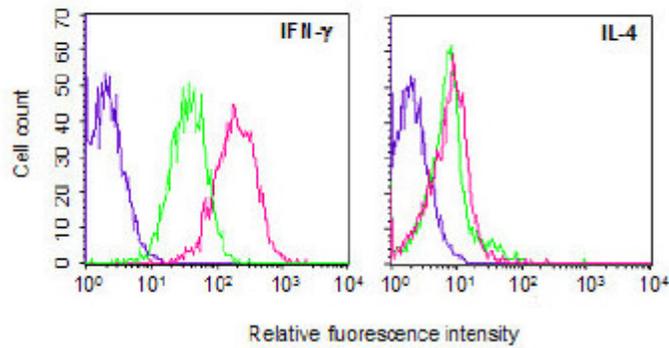
Figure 5

A : 251-265/I

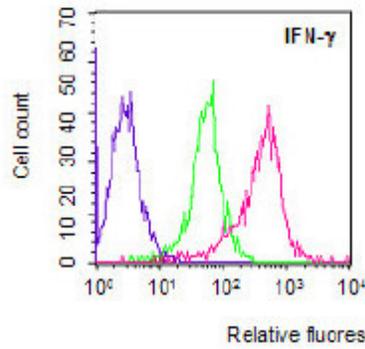


— Isotype control
— Untreated imDC
— Peptide-treated imDC

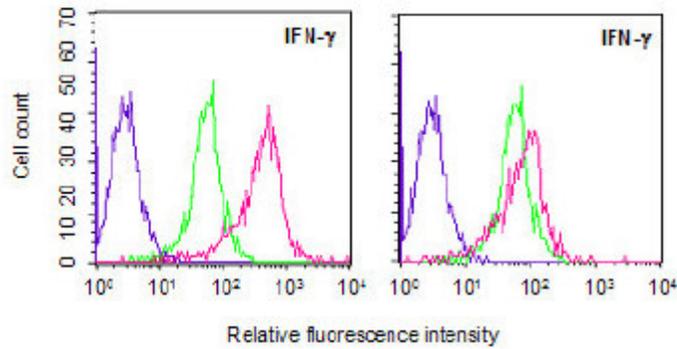
B : 251-265/II-III



C : 251-265/I + anti-IL-10



D : 251-265/II-III + anti-IL-12



— Isotype control
— Untreated imDC
— Peptide and Ac-cotreated imDC

Table I

Table I. Phenotypic analysis by flow cytometry of imDC treated or not with different concentrations of 251-265/I or 251-265/II-III *T. gondii* peptides

	CD14	CD80	CD83 ^{low} ^a	CD83 ^{high}	CD86	CD1a
Control (untreated imDC)	1.7 ± 0.5 ^b	11.4 ± 2.5	14.3 ± 2.9	-	64 ± 16.2	704 ± 138
LPS (1 µg/mL)	1.2 ± 0.3	178 ± 51	-	603 ± 33	199 ± 33	645 ± 131
SP (1 µg/mL)	1,1 ± 0.1	8,9 ± 2,1	10,1 ± 2,1	-	54 ± 18	538 ± 71
STge (50 µg/mL)	1.9 ± 0.3	194 ± 23	10.3 ± 1.2 (53 ± 4.6%) ^c	637 ± 52 (47 ± 4.6%)	115 ± 13.5	664 ± 123
251-265/I (pg/mL)						
0.01	1.4 ± 0.6	13.9 ± 3.1	12.7 ± 1.8	-	68.7 ± 20.3	643 ± 163
0.1	2.1 ± 1.1	66.2 ± 29.5	11.8 ± 1.8 (43.1 ± 2.9%)	934 ± 125 (56.9 ± 2.9%)	59.2 ± 23.1	904 ± 175
1	1.5 ± 0.3	65.6 ± 20.1	12.7 ± 2.2 (40.3 ± 3.5%)	887 ± 195 (59.7 ± 3.5%)	65.7 ± 20.3	868 ± 145
251-265/II (pg/mL)						
0.01	2.1 ± 0.5	12.8 ± 2.3	11.7 ± 1.6	-	59.7 ± 17.3	673 ± 102
0.1	1.8 ± 0.4	68.2 ± 20.5	13.3 ± 2.5 (56 ± 13%)	982 ± 367 (55.3 ± 6.7%)	65.7 ± 20.3	714 ± 210
1	1.8 ± 0.6	82.3 ± 15.5	12.9 ± 1.8 (42.7 ± 4%)	1071 ± 406 (57.3 ± 4%)	68.5 ± 8.9	1102 ± 292

^aExpression level of cell surface molecule on imDC named as negative, low, +, ++, or high was determined on the basis of the peak channel of fluorescence intensity. Correspondence was as following : peak channel fluorescence intensities between 1-5, 5.1-30, 31-100, 101-400, or >400 correspond to a negative, low, +, ++, or high expression level, respectively.

^bMean ± SD (n = 5) of the peak channel of fluorescence intensity determined from histograms obtained with specific antibodies

^cPercentage ± SD (n = 5) of imDC expressing the maturation marker CD83 at low or high level

Maggy MARLE-PLISTAT

***Toxoplasma gondii* : Réponse immune vis à vis de peptides de SAG1.**

Th. Med.univ. : Reims : 2005

Résumé :

SAG1 est une protéine majeure de surface de *Toxoplasma gondii* hautement immunogène. En combinant la localisation des sites de polymorphisme chez SAG1 et un algorithme prédictif, nous avons sélectionné deux peptides spécifiques d'allèles séparant les souches de type I et atypiques des types II/III.

Nous avons montré que ces peptides sont suffisamment antigéniques pour être reconnus par les anticorps spécifiques de sérums humains sans qu'un sérotypage puisse être réalisé. Ces peptides sont également immunogènes et entraînent une diminution de la charge parasitaire chez des souris immunisées et inoculées avec une souche de type II. Les peptides spécifiques d'allèles induisent une production différentielle de cytokines par les cellules dendritiques immatures humaines activant les lymphocytes T autologues. Seul le peptide représentatif des souches de type II/III oriente l'immunité vers un type Th-1, protecteur. Notre travail illustre le rôle critique de peptides spécifiques d'allèles de SAG1 dans l'orientation de la réponse cellulaire T par l'induction de la production de cytokines par les cellules dendritiques.

Comme perspective, nous proposons le choix d'autres peptides sélectionnés sur le gène GRA7 dont nous avons mis en évidence le polymorphisme.

Mots clés :

Toxoplasma gondii, SAG1, Peptides spécifiques d'allèles, Protection, Cellules Dendritiques, Cytokines, Dichotomie Th-1/Th-2, ELISA, Cytométrie en Flux.

Pr. Hervé Pelloux

Président

Pr. Ermanno Candolfi

Rapporteur

Pr. Isabelle Villena

Examineur

Pr. Sophie Gangloff

Examineur

Dr. Dominique Aubert

Directeur de Thèse

Dr. Richard Le Naour

Directeur de Thèse

Adresse de l'auteur

Mme Plistat Maggy,
2 Parc Xeraco, 31150 Bruguères.