

**Thèse présentée pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université Louis Pasteur
Strasbourg I**

Discipline : Sciences du Vivant

Présentée par Valérie LETSCHER

**VACCINATION AVEC LA PROTEINE SAG1
DE *TOXOPLASMA GONDII* DANS UN MODELE DE
TOXOPLASMOSE CONGENITALE CHEZ LA SOURIS**

Soutenue publiquement le 07 décembre 2004

Membres du Jury

Directeur de Thèse : Monsieur le Professeur Ermanno CANDOLFI, Strasbourg

Rapporteur externe : Monsieur le Professeur Hervé PELLOUX, Grenoble

Rapporteur externe : Madame le Docteur BUZONI-GATEL, Paris

Rapporteur interne : Madame le Docteur Marie SCHOLLER, Strasbourg

Examineur : Madame le Docteur Christiane MOOG, Strasbourg

Monsieur le Professeur Hervé Pelloux, Président du Jury.

Vous nous faites l'honneur de juger notre travail et de présider ce Jury.

*Nous avons pu apprécier votre compétence dans le domaine de la Parasitologie
fondamentale et appliquée, ainsi que votre disponibilité pour l'analyse de ce travail.*

Veillez trouver ici l'expression de notre sincère gratitude.

Monsieur le Professeur Ermanno Candolfi.

Vous nous avez guidée tout au long de ce travail tout en nous laissant une grande liberté dans sa réalisation.

Vous nous avez fait partager avec enthousiasme vos connaissances et votre expérience scientifique dans le domaine de l'Immunologie Parasitaire.

Veuillez accepter ici l'expression de notre profond respect et de notre reconnaissance.

Aux Membres du Jury

Madame le Docteur Dominique Buzoni-Gatel

Vous nous faites un grand honneur en acceptant de juger ce travail.

Nous avons pu apprécier vos connaissances et vos compétences dans le domaine de l'Immunologie et en particulier dans le domaine de l'immunité toxoplasmique.

Veuillez trouver ici l'expression de notre vive reconnaissance.

Madame le Docteur Marie Schöller

Vous nous faites l'honneur et l'amitié de juger ce travail.

Nous vous en remercions vivement.

Madame le Docteur Christiane Moog

Nous vous remercions vivement d'avoir accepté de faire partie de ce jury.

Je tiens également à remercier

Monsieur le Docteur E. Petersen (Institut de Biologie Moléculaire à Copenhague)

Pour nous avoir gracieusement fourni la protéine SAG1 recombinante.

Monsieur le Docteur Philippe Thulliez (Institut de Puériculture à Paris)

Pour la réalisation des Dye Tests dans le cadre de l'étude des mécanismes d'action des anticorps anti-SAG1.

Madame le Docteur Dominique Buzoni-Gatel (Institut Pasteur à Paris)

Pour nous avoir mis à disposition gracieusement les hybridomes pour la production des anticorps monoclonaux de rat anti-CD8 et anti-IFN γ .

Madame le Docteur Anne-Marie Aubertin (Institut de Virologie de Strasbourg)

Pour la mise à disposition du FACscan

et Madame Liliane Gloeckler (Institut de Virologie de Strasbourg)

Pour sa collaboration technique sur l'appareil.

Je tiens enfin à remercier tout particulièrement

Madame le Docteur Odile Villard

Pour son amitié, son soutien et ses conseils précieux tout au long de la réalisation de ce travail, ainsi que pour sa relecture critique du manuscrit.

Monsieur le Docteur Jocelyn Waller

Pour m'avoir déchargée de l'activité d'analyse au Laboratoire de Mycologie et m'avoir ainsi permis de terminer ce travail dans les meilleures conditions.

Madame Elisabeth Antoni

Son support technique, sa compétence et sa disponibilité ont été une aide précieuse tout au long de la réalisation de ce travail.

Mesdames Sylvie Mattern, Françoise Bay et Elisabeth Lienhart

Pour leur participation technique.

Toute l'équipe de l'Institut de Parasitologie pour leur amitié.

Ma famille, mes amis.

ABREVIATIONS

ABTS	2.2'-azino-bis (3 ethylbenzithiazoline-6-sulfonic acid)
AST	Antigène soluble toxoplasmique
Brdu	Bromodéoxyuridine
BSA	Bovine serum albumin
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
ConA	Concanavaline A
ELISA	Immunosorbent linked immuno sorbent assay
FcR	Récepteur pour le fragment Fc des immunoglobulines
GPI	Glycosyl phosphatidyl inositol
IEL	Intra epithelial lymphocyte
IFN	Interféron
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
kDa	KiloDalton
LBA	Lavage bronchioloalvéolaire
LPS	Lipopolysaccharide
MGG	May Grünwald Giemsa
NK	Natural Killer
NKT	Natural Killer T
NO	Nitric oxide
PBS	Phosphate Buffer Saline
PCR	Polymerase chain reaction
PEG	Polyéthylène glycol
SAG	Surface antigen
SDS	Dodécyl sulfate de sodium
SRS	SAG1-related sequence
SVFi	Sérum de veau fœtal inactivé
TE	Tris EDTA
TGF	Transforming growth factor
Th	T helper
TNF	Tumor necrosis factor

PLAN

INTRODUCTION.....	12
--------------------------	-----------

I. <i>TOXOPLASMA GONDII</i>.....	13
---	-----------

II. LA TOXOPLASMOSE HUMAINE.....	18
---	-----------

1. Toxoplasmose du sujet immunocompétent.....	19
2. Toxoplasmose du sujet immunodéprimé.....	19
3. Toxoplasmose congénitale.....	19

III. PHYSIOPATHOLOGIE DE LA TOXOPLASMOSE.....	22
--	-----------

1. Toxoplasmose acquise.....	23
2. Toxoplasmose congénitale.....	23

IV. REPONSE IMMUNITAIRE AU COURS DE LA TOXOPLASMOSE.....	24
---	-----------

1. Réponse immunitaire non spécifique.....	24
2. Réponse immunitaire spécifique.....	27
3. Rôle des cytokines.....	29
4. Influence de la gestation sur la réponse immunitaire maternelle.....	35

V. VACCINATION CONTRE LA TOXOPLASMOSE : SITUATION DE LA	
--	--

 QUESTION.....	38
--------------------------	-----------

1. Vaccins vivants.....	38
2. Vaccins sous-unitaires protéiques et vaccins ADN.....	40

OBJECTIFS.....	49
-----------------------	-----------

MATERIEL ET METHODES.....51

I. MATERIEL.....	52
1. Animaux.....	52
2. Souches parasitaires.....	52
3. Antigènes parasitaires.....	53
4. Production des anticorps monoclonaux.....	53
5. Préparation des fragments Fab.....	53
II. METHODES.....	57
1. Modèle expérimental.....	57
1.1. Protocole vaccinal.....	57
1.2. Infection congénitale.....	57
2. Détermination de l'infection congénitale.....	58
3. Mesure de la parasitémie maternelle.....	58
4. Etude du profil de la réponse immunitaire maternelle.....	61
4.1. Titrage des anticorps spécifiques.....	61
4.2. Réponse lymphocytaire splénique.....	62
4.2.1. Purification des splénocytes.....	62
4.2.2. Numération des sous-populations lymphocytaires T CD4+/CD8+ par cytométrie en flux.....	63
4.2.3. Etude de la prolifération lymphocytaire.....	64
4.2.4. Production de cytokines.....	65
5. Exploration du rôle des anticorps anti-SAG1.....	65
5.1. Anticorps.....	65
5.2. Transfert passif des anticorps <i>in vivo</i>	66
5.3. Etude du mécanisme d'action des anticorps <i>in vitro</i>	66
5.3.1. Phagocytose.....	66
5.3.2. Test de lyse par le complément.....	68
5.3.3. Test d'invasion cellulaire.....	68
6. Exploration du rôle de l'immunité cellulaire.....	69
6.2. Etudes <i>in vivo</i>	70
6.2.1. Transfert adoptif de lymphocytes T.....	70

6.2.2. Déplétion des lymphocytes T CD4+ et CD8+.....	70
6.2.3. Neutralisation de l'IFN γ	71
6.3. Etudes de cytotoxicité <i>in vitro</i>.....	71
7. Activité toxoplasmodique des macrophages.....	73
8. Analyse statistique.....	75
9. Résumé du plan expérimental.....	76

RESULTATS.....75

I. IMMUNOGENICITE DE LA PROTEINE SAG1 CHEZ LA SOURIS NON GESTANTE.....	78
---	-----------

II. PROTECTION VACCINALE CHEZ LA SOURIS GESTANTE ET PROFIL DE LA REPOSE IMMUNITAIRE MATERNELLE.....	79
1. Transmission maternofoetale du parasite.....	80
2. Parasitémie maternelle.....	81
3. Profil de la réponse immunitaire maternelle.....	84

III. ROLE DE L'IMMUNITE HUMORALE DANS LA PROTECTIONVACCINALE CONFERE PAR LA PROTEINE SAG1.....	90
1. Transfert passif d'anticorps anti-SAG1.....	90
2. Etude des mécanismes d'action des anticorps anti-SAG1.....	94
2.1. Phagocytose.....	94
2.2. Lyse par le complément	97
2.3. Neutralisation	97

IV. ROLE DE L'IMMUNITE CELLULAIRE DANS LA PROTECTION VACCINALE CONFERE PAR LA PROTEINE SAG1.....	102
1. Caractérisation des sous-populations lymphocytaires T CD4+ et CD8+ après vaccination.....	102
2. Transfert adoptif de lymphocytes T de souris vaccinées.....	106
3. Déplétion des sous-populations T CD4+ et CD8+ chez la souris vaccinée.....	109

4. Neutralisation de l'IFNγ chez la souris vaccinée.....	119
5. Etude de l'activité cytotoxique des lymphocytes T des souris vaccinées.....	123
5.1. Activité cytotoxique globale des lymphocytes T.....	123
5.2. Rôle des sous-populations lymphocytaires T CD4+ et CD8+.....	127
5.3. Rôle de l'IFNγ	131

V. ACTIVITE TOXOPLASMICIDE DES MACROPHAGES.....	134
--	------------

DISCUSSION.....	138
------------------------	------------

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	167
---	------------

REFERENCES.....	173
------------------------	------------

PUBLICATIONS ISSUES DE CE TRAVAIL.....	195
---	------------

INTRODUCTION

I. TOXOPLASMA GONDII

Toxoplasma gondii est un protozoaire parasite cosmopolite découvert en 1908 par Nicolle et Manceaux chez un rongeur (Nicolle et Manceaux, 1909). Il appartient à l'Embranchement des *Apicomplexa*, à la Classe des Sporozoaires et à la Sous-classe des Coccidies. Le genre *Toxoplasma* ne contient qu'une seule espèce : *T. gondii*.

***T. gondii* est un parasite obligatoire dont le cycle de développement comprend 3 stades évolutifs :**

- **le sporozoïte** est issu de la reproduction sexuée du parasite. Il est éliminé dans le milieu extérieur sous forme d'oocystes contenant quatre sporozoïtes.
- **le tachyzoïte** est une forme végétative intracellulaire hautement répliquative, mesurant 6-8 μm x 2-3 μm . Présent pendant la phase aiguë de l'infection toxoplasmique, il infecte les cellules nucléées de l'hôte et s'y multiplie rapidement au sein d'une vacuole parasitophore qui le protège de l'acidification et empêche la fusion avec les lysosomes.
- **le bradyzoïte** est une forme végétative intracellulaire de multiplication lente. Il dérive du tachyzoïte et caractérise la phase chronique de l'infection toxoplasmique. La division lente des bradyzoïtes aboutit à la formation d'une structure kystique de 20 à 200 μm .

Le cycle évolutif de *T. gondii* est hétéroxène.

Il se déroule entre un hôte définitif féliné (principalement le chat) et un hôte intermédiaire vertébré à sang chaud. Le cycle comprend une phase de multiplication sexuée chez l'hôte définitif, aboutissant à la formation des oocystes et à leur élimination dans le milieu extérieur,

et une phase de multiplication asexuée des tachyzoïtes puis des bradyzoïtes chez l'hôte définitif et chez l'hôte intermédiaire, aboutissant à la formation de kystes tissulaires.

Le passage du parasite entre les hôtes se fait par ingestion des oocystes présents dans le milieu extérieur ou des kystes tissulaires. L'homme se contamine de la même manière par voie orale.

Si la primo-infection survient pendant la gestation, le fœtus peut être contaminé par voie transplacentaire par les tachyzoïtes circulant dans le sang maternel.

Le cycle est schématisé sur la figure 1.

La structure générale et l'ultrastructure de *T. gondii* sont illustrées figure 2.

Comme tous les parasites intracellulaires de l'Embranchement des *Apicomplexa*, *T. gondii* possède une organisation cellulaire polarisée contrôlée par un cytosquelette élaboré et caractérisée par la présence d'un complexe apical. Composé du conoïde, des rhoptries et des micronèmes, le complexe apical permet l'entrée active rapide (en 15 à 30 secondes) du parasite dans les cellules dans lesquels il se multiplie à l'intérieur d'une vacuole parasitophore. *T. gondii* possède trois compartiments sécrétoires, les micronèmes, les rhoptries et les granules denses, qui déchargent successivement leur contenu au cours du processus d'invasion cellulaire (Carruthers, 2002).

Figure 1. Cycle de *T. gondii*.

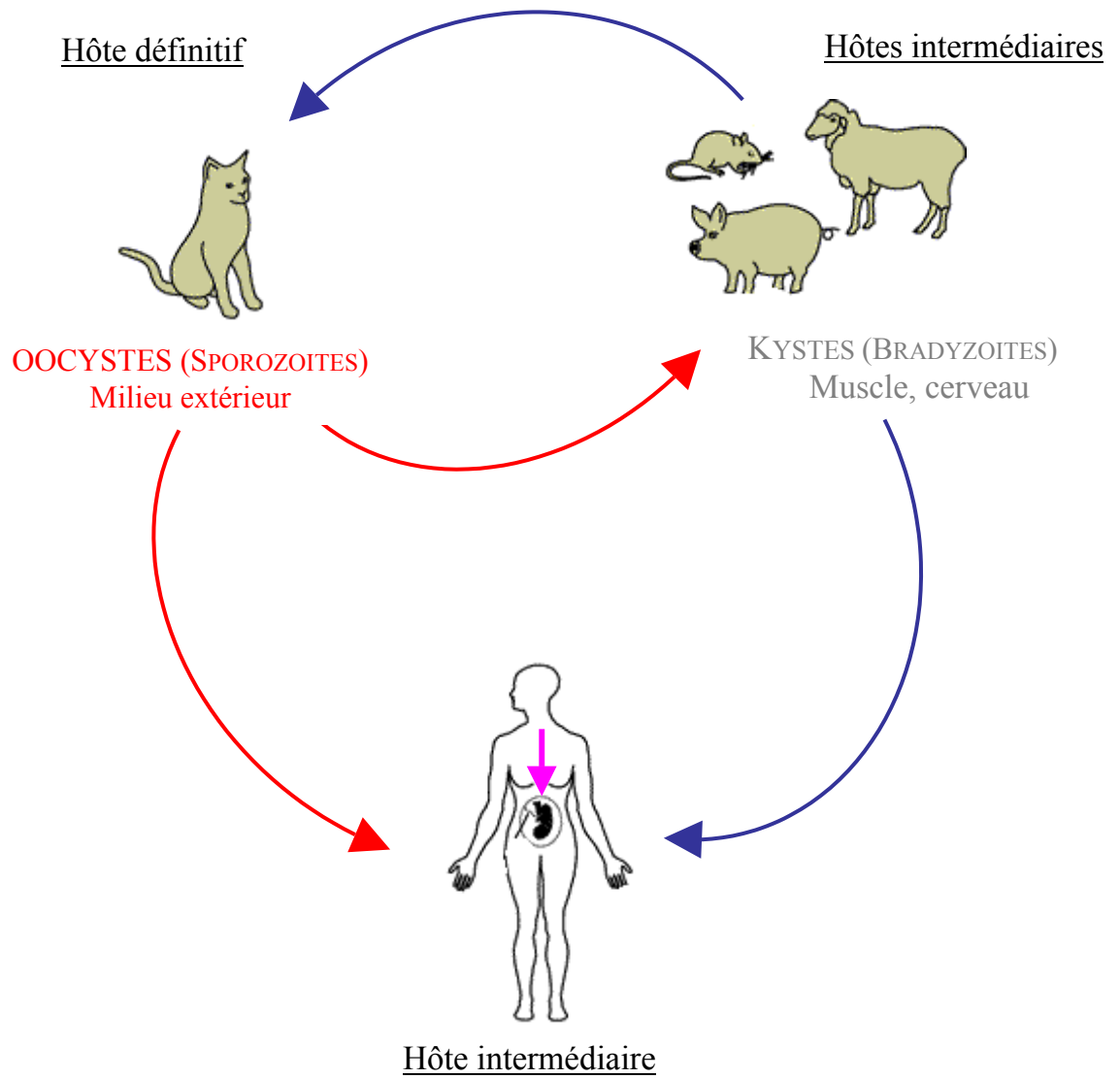
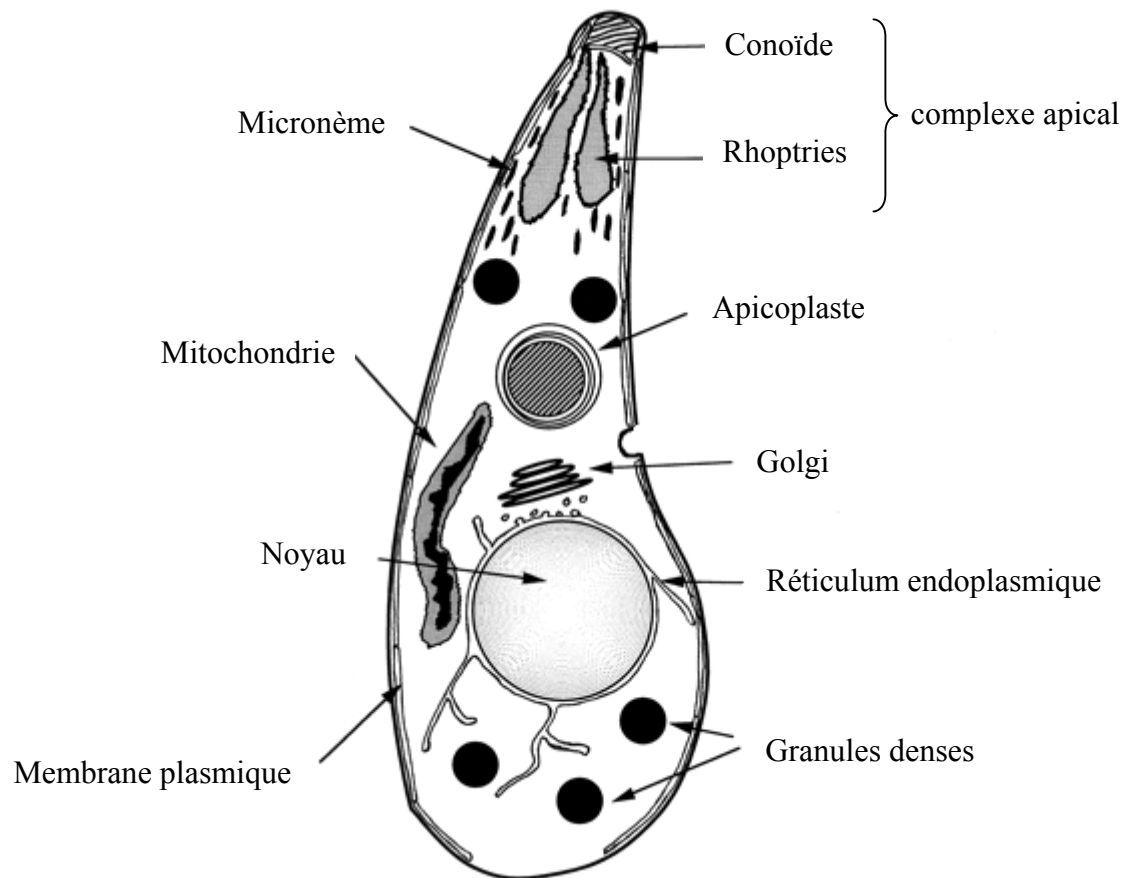


Figure 2. Structure générale et ultrastructure de *T. gondii*.

Adapté de (Black et Boothroyd, 2000).



La structure moléculaire de *T. gondii* fait l'objet de nombreux travaux visant notamment à identifier les protéines constitutives du parasite.

On distingue les protéines de surface et les protéines contenues dans les organelles sécrétoires du parasite -les micronèmes, les rhoptries et les granules denses- qui participent directement à la pénétration du parasite et à sa survie dans la cellule cible. Certaines protéines sont communes à deux ou aux trois stades évolutifs du parasite, d'autres sont au contraire spécifiques d'un stade donné.

- **les protéines de surface** (Surface Antigen = protéines SAG).

Plus de 20 protéines de surface ont été identifiées à ce jour (Lekutis *et al.*, 2001). Elles appartiennent à 5 superfamilles dénommées SAG1 à SAG5. Toutes sont ancrées à la surface du parasite par une ancre GPI. Elles participent à l'attachement et à l'invasion cellulaire ainsi qu'à la modulation de la réponse immunitaire.

La superfamille SAG1 est la plus abondante. Elle comprend la protéine SAG1 proprement dite, dont la structure tridimensionnelle homodimérique a été récemment caractérisée par cristallographie (He *et al.*, 2002) et de nombreuses protéines homologues SRS (SAG1-related-sequence) dont l'identification et la caractérisation débutent actuellement (Jung *et al.*, 2004).

- **les protéines des micronèmes** (protéines MIC).

Environ vingt protéines MIC ont été identifiées à ce jour dans les micronèmes du complexe apical du parasite (Carruthers, 2002).

Elles sont excrétées lors du contact cellulaire et participent à l'attachement du parasite (Carruthers *et al.*, 1999) et à son entrée dans la cellule cible (Keeley et Soldati, 2004).

- **les protéines des rhoptries** (protéines ROP).

Neuf protéines ROP ont été identifiées dans les rhoptries.

Elles sont sécrétées pendant l'invasion cellulaire puis intégrées à la vacuole parasitophore (Joiner et Roos, 2002; Ngo *et al.*, 2004). Les protéines ROP2 et ROP4 sont présentes en position transmembranaire à la surface de la vacuole parasitophore (Beckers *et al.*, 1994; Carey *et al.*, 2004).

- **les protéines des granules denses** (protéines GRA).

Dix protéines GRA ont été identifiées à ce jour dans les granules denses.

Elles sont sécrétées dans la vacuole parasitophore après l'entrée du parasite dans la cellule. Les protéines GRA2, GRA4, GRA6 et GRA9 sont présentes en position transmembranaire sur le réseau membranaire interne à la vacuole parasitophore (Adjogble *et al.*, 2004). Les protéines GRA contribuent à l'acquisition des nutriments nécessaires à la réplication parasitaire (Leriche et Dubremetz, 1990) ainsi qu'à la modulation de la réponse immunitaire (Neudeck *et al.*, 2002).

II. LA TOXOPLASMOSE HUMAINE

L'homme se contamine en ingérant des oocystes présents dans le milieu extérieur ou des kystes contenus dans la viande. La contamination par les tachyzoïtes est exceptionnelle à l'exception du fœtus qui se contamine à partir des tachyzoïtes circulant dans le sang maternel à l'occasion d'une primo-infection.

Trois situations cliniques doivent être distinguées :

1. Toxoplasmose acquise du sujet immunocompétent

Habituellement asymptomatique, elle peut parfois se traduire par un syndrome pseudogrippal accompagné ou non d'adénopathies (Ho Yen et Joss, 1992; Montoya et Liesenfeld, 2004). Des atteintes viscérales sévères sont possibles mais exceptionnelles. La primo-infection évolue ensuite spontanément vers une phase chronique asymptomatique qui persiste toute la vie en l'absence de déficit immunitaire. Le diagnostic de la toxoplasmose acquise est basé sur la mise en évidence d'une séroconversion toxoplasmique.

2. Toxoplasmose du sujet immunodéprimé

Elle touche des sujets présentant une immunosuppression sévère (SIDA, allogreffe de moelle osseuse, greffe d'organe) et résulte soit d'une primo-infection soit d'une réactivation à partir des kystes présents chez un sujet antérieurement infecté (Ho Yen et Joss, 1992; Mele *et al.*, 2002). Dans le cas des transplantations d'organes, la réactivation peut se faire à partir du greffon si celui-ci est infecté (Giordano *et al.*, 2002). La toxoplasmose du sujet immunodéprimé se traduit par une infection aiguë disséminée d'évolution souvent fatale ou par une forme purement cérébrale évoluant sous forme d'encéphalite dans le cas d'une réactivation. Dans ces situations de multiplication active du parasite, le diagnostic repose principalement sur la mise en évidence par PCR de l'ADN parasitaire dans le LCR, le sang ou le LBA. La sérologie est souvent peu informative chez ces patients profondément immunodéprimés.

3. Toxoplasmose congénitale

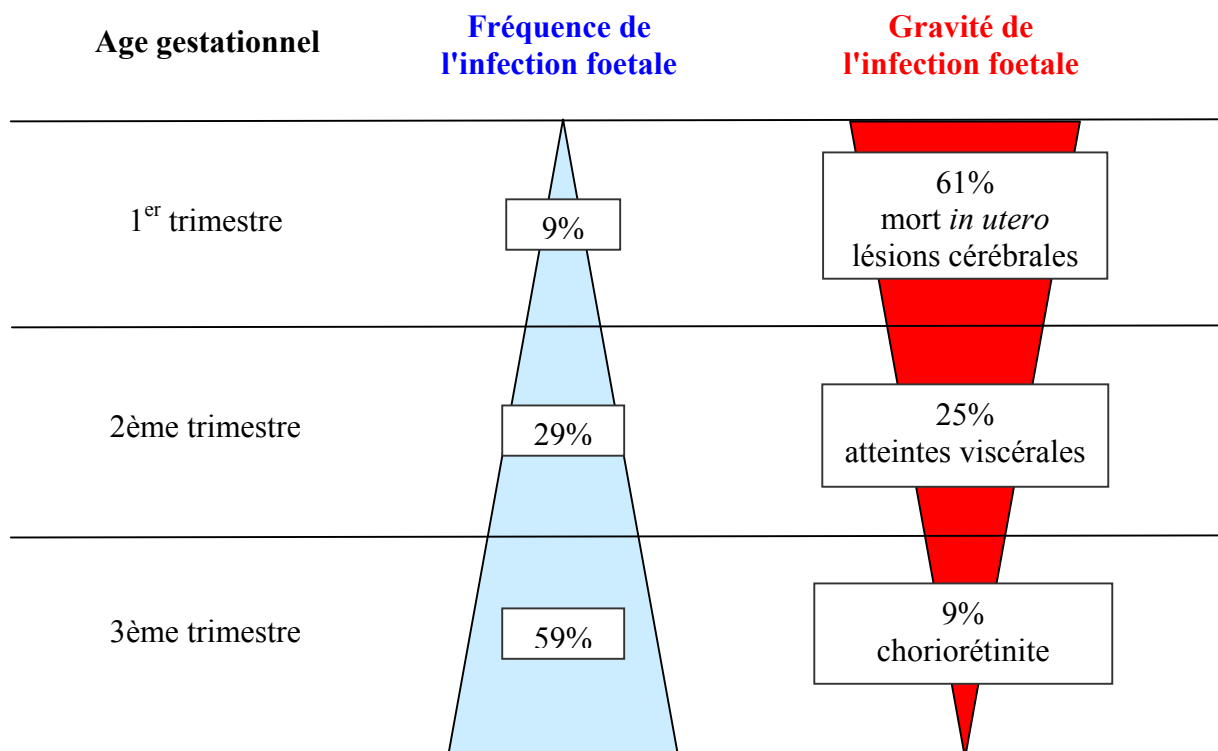
La toxoplasmose congénitale résulte du passage transplacentaire des parasites circulant dans le sang maternel au cours d'une primo-infection chez la femme enceinte. Les mécanismes exacts du passage transplacentaire ne sont pas connus.

La probabilité de transmission du parasite au fœtus et la gravité de l'atteinte fœtale évoluent inversement au cours de la grossesse (Desmonts et Couvreur, 1974; Dunn *et al.*, 1999; Montoya et Liesenfeld, 2004) (figure 3). En début de grossesse, le risque de transmission est inférieur à 10% mais l'atteinte fœtale est sévère, se traduisant par la mort *in utero* du fœtus ou par des lésions cérébrales graves avec décès à la naissance ou retard psychomoteur majeur. Au deuxième trimestre, le risque cumulé de toxoplasmose congénitale sévère est maximum, avec une prédominance de formes viscérales aiguës d'évolution souvent fatale à la naissance. Au troisième trimestre, le risque de transmission dépasse 60% et atteint 80% en fin de grossesse. A ce stade, un retard de développement reste possible mais les lésions sont le plus souvent infracliniques. Une chorioretinite peut apparaître tardivement à la puberté.

En France, le suivi sérologique mensuel des femmes enceintes séronégatives est obligatoire depuis 1985. En cas de séroconversion toxoplasmique, un diagnostic prénatal est réalisé pour rechercher la présence du parasite dans le liquide amniotique par PCR. A la naissance, les examens sont complétés par la recherche du parasite dans le placenta et par le suivi sérologique de l'enfant. Un traitement par Rovamycine® est débuté dès la séroconversion et jusqu'à la naissance de l'enfant avec une éventuelle adaptation si le diagnostic prénatal est positif. Dans ce cas, le traitement est poursuivi chez l'enfant après la naissance. Ces modalités de dépistage et de prise en charge précoce ont considérablement réduit la gravité des lésions fœtales sans pour autant réduire le nombre d'infections pendant la grossesse. La fréquence de la toxoplasmose congénitale est actuellement de 2 à 3 pour 1000 naissances en France.

Figure 3. Risque de transmission parasitaire et gravité de l'atteinte fœtale au cours d'une primo-infection toxoplasmique chez la femme enceinte.

Adapté de (Desmonts et Couvreur, 1974; Dunn *et al.*, 1999).



III. PHYSIOPATHOLOGIE DE LA TOXOPLASMOSE

1. Toxoplasmose acquise

Les kystes ou les oocystes ingérés libèrent respectivement des bradyzoïtes et des sporozoïtes dans l'intestin. Les parasites pénètrent dans l'épithélium intestinal par leur complexe apical et se différencient immédiatement en tachyzoïtes qui se multiplient localement et/ou traversent activement l'épithélium digestif pour disséminer dans tout l'organisme via le système lymphatique puis sanguin (Dubey, 1997; Dubey *et al.*, 1997). La dissémination des tachyzoïtes pourrait se faire sous forme libre ou sous forme intracellulaire dans les leucocytes (Barragan et Sibley, 2002; Barragan et Sibley, 2003). Cette phase de dissémination s'accompagne d'une multiplication active des tachyzoïtes dans les cellules et constitue la phase aiguë de la primo-infection toxoplasmique qui dure quelques semaines, pendant lesquelles se mettent en place des mécanismes de défense immunitaire d'abord non spécifiques puis spécifiques sur lesquels nous reviendrons. Sous l'action de la réponse immunitaire, notamment de l'IFN γ , la multiplication parasitaire ralentit puis les tachyzoïtes intracellulaires se transforment en bradyzoïtes qui s'enkystent lentement dans les tissus, marquant le début de la phase chronique de l'infection. Les kystes persistent à l'état quiescent durant toute la vie et entretiennent une réponse immunitaire spécifique protectrice.

Lorsqu'un état d'immunosuppression apparaît, lymphocytaire T en particulier, les bradyzoïtes se réactivent et, en l'absence de contrôle immunitaire, se transforment en tachyzoïtes réplikatifs responsables d'un épisode de réactivation toxoplasmique. La multiplication parasitaire locale génère des zones de nécrose à l'origine des signes cliniques. La réactivation concerne préférentiellement les bradyzoïtes enkystés dans le système nerveux central et dans l'œil qui contiennent peu de cellules immunitaires. Les atteintes observées sont alors principalement des abcès cérébraux et des chorioretinites.

2. Toxoplasmose congénitale

La toxoplasmose congénitale résulte de la transmission maternofoetale du parasite lors d'une primo-infection maternelle pendant la grossesse. Il n'y a pas de transmission chez la femme immunisée par une infection antérieure à la grossesse car la réponse immunitaire spécifique présente est protectrice et contrôle la dissémination parasitaire.

Les mécanismes du passage transplacentaire du parasite et de l'infection fœtale sont encore mal connus car les études *in vitro* sur les cellules placentaires sont limitées et les modèles expérimentaux sont délicats à mettre en œuvre. Finalement, les résultats sont difficiles à extrapoler à la physiopathologie de l'infection humaine car l'anatomie de l'unité fœto-placentaire et la réponse immunitaire varient selon l'espèce animale.

Après la contamination orale, les parasites traversent rapidement l'épithélium digestif et gagnent le sang maternel. Cette phase parasitémique dure quelques jours à quelques semaines pendant lesquelles les parasites pénètrent dans les cellules trophoblastiques et s'y multiplient comme dans toutes les cellules nucléées de l'organisme (Ferro *et al.*, 2002). L'infection placentaire pourrait se faire directement par des tachyzoïtes libres ou par le biais de leucocytes infectés venant adhérer au placenta (Ferro *et al.*, 2002). Le parasite serait ensuite transmis au fœtus à partir du placenta *via* le sang fœtal. Plusieurs hypothèses sont évoquées : invasion cellulaire de proche en proche avec multiplication parasitaire et destruction des cellules placentaires, traversée active des cellules placentaires sans multiplication ni destruction par un mécanisme de "glissement" ou apoptose et nécrose des trophoblastes permettant le passage du parasite (Abbasi *et al.*, 2003; Barragan et Sibley, 2002; Barragan et Sibley, 2003).

IV. REPONSE IMMUNITAIRE AU COURS DE LA TOXOPLASMOSE

Chez le sujet immunocompétent, la primo-infection toxoplasmique induit une réponse immunitaire spécifique protectrice à vie, entretenue par la persistance dans l'organisme des kystes contenant des bradyzoïtes quiescents.

La réponse immunitaire non spécifique initiale et la réponse adaptative spécifique qui apparaît ensuite ont fait l'objet de nombreux travaux dont se dégage un certain consensus.

1. Réponse immunitaire non spécifique

Elle est initiée par l'envahissement des entérocytes par le parasite après l'ingestion des kystes ou des oocystes. La réponse inflammatoire débute localement au niveau de la muqueuse digestive infectée puis s'étend à l'ensemble de l'organisme. Elle participe au contrôle de la multiplication parasitaire et à la mise en place de la réponse spécifique protectrice.

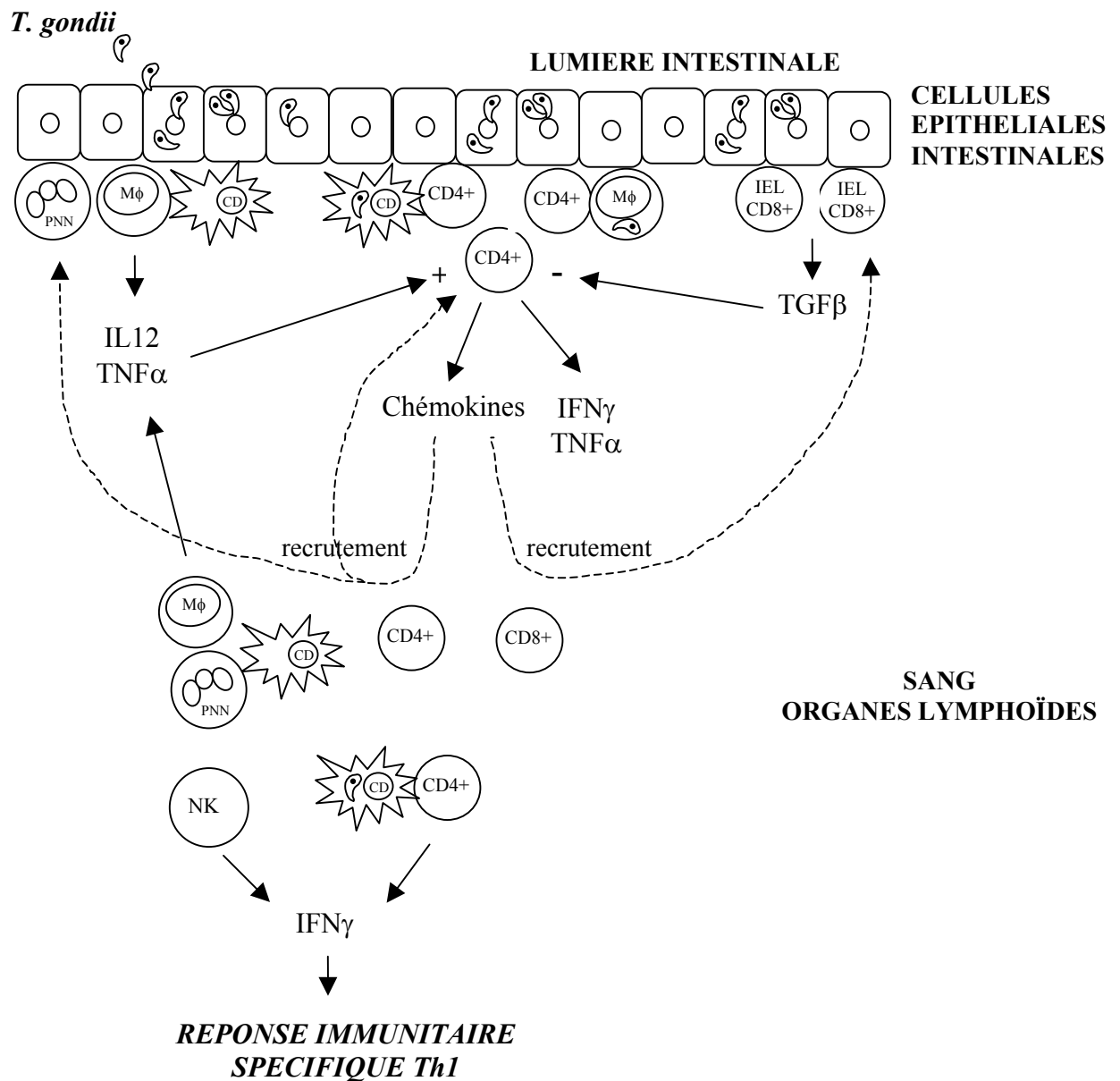
La cascade des événements est schématisée figure 4.

L'infection des entérocytes par le parasite déclenche la sécrétion de chémokines (MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , MIP-2, RANTES) qui recrutent rapidement des cellules inflammatoires (polynucléaires neutrophiles, macrophages, cellules NKT, cellules dendritiques) au site de l'infection (Denkers *et al.*, 2004; Kasper *et al.*, 2004). Les cellules inflammatoires activées sécrètent à leur tour des chémokines, lesquelles amplifient le recrutement cellulaire au site de l'infection, et des cytokines proinflammatoires (TNF α et IL12). L'IL12 induit une production locale massive d'IFN γ par les cellules inflammatoires elles-mêmes et surtout par les lymphocytes T (majoritairement CD4+) présents dans la *lamina propria* ou recrutés par les chémokines à partir du sang et des organes lymphoïdes.

Les cellules inflammatoires, activées par l'IFN γ et le TNF α , exercent une activité toxoplasmodicide et contrôlent la réplication parasitaire (Sibley *et al.*, 1991). Plusieurs mécanismes sont décrits : mécanismes oxydatifs (Murray et Cohn, 1979), production de réactifs nitrés intermédiaires qui interfèrent avec des enzymes métaboliques essentielles du parasite (Adams *et al.*, 1990; Scharton-Kersten *et al.*, 1997), activation de l'indolamine 2,3-déoxygénase qui dégrade le tryptophane indispensable au parasite (MacKenzie *et al.*, 1999; Silva *et al.*, 2002), production de protéines liant le GTP (IGTP et LRG-47) dont le mécanisme d'action exact n'est pas encore élucidé (Collazo *et al.*, 2001).

Dans le même temps, une réponse immunitaire spécifique Th1 se met progressivement en place, initiée par l'IL12 et par la présentation des antigènes parasitaires aux lymphocytes T CD4⁺ (Kasper *et al.*, 2004). La production d'IFN γ qui en résulte intensifie la réponse inflammatoire. Parallèlement au développement de la réponse Th1, les chémokines MIP-1 α et MIP-1 β produites par les entérocytes infectés recrutent des lymphocytes intraépithéliaux, essentiellement des lymphocytes T CD8⁺ $\alpha\beta$ et $\gamma\delta$, qui régulent localement cette réponse inflammatoire intense en produisant du TGF β . Le TGF β réduit la production d'IFN γ par les lymphocytes T CD4⁺ de la *lamina propria* et évite ainsi l'apparition de lésions de nécrose locale par hyperinflammation (Mennechet *et al.*, 2004).

Figure 4. Réponse immunitaire non spécifique et mise en place de la réponse adaptative après primo-infection orale (adapté de (Denkers *et al.*, 2004; Kasper *et al.*, 2004)).



PNN : polynucléaires neutrophiles; Mφ : macrophages; CD : cellules dendritiques;

CD4+ : lymphocytes CD4+; CD8+ : lymphocytes CD8+; IEL : lymphocytes intraépithéliaux;

NK : cellules NK.

2. Réponse immunitaire spécifique

La réponse immunitaire adaptative se met progressivement en place durant la phase de réponse inflammatoire qui suit la contamination. La résistance à l'infection est très clairement associée à une réponse Th1 à médiation cellulaire dont les effecteurs majeurs sont les lymphocytes T CD8⁺ et l'IFN γ . De nombreux travaux réalisés chez la souris ont permis de comprendre les mécanismes de la mise en place et la régulation de la réponse immunitaire spécifique. Ces mécanismes sont résumés figure 5.

Le rôle de la réponse immunitaire spécifique est double. Pendant la phase aiguë de l'infection, elle participe au contrôle de la multiplication parasitaire puis induit le passage à la forme chronique par transformation des tachyzoïtes hautement réplicatifs en bradyzoïtes peu réplicatifs contenus dans les kystes. Pendant la phase chronique de l'infection, l'immunité spécifique maintient les parasites sous forme quiescente et empêche leur réactivation.

- **Rôle des lymphocytes T et de l'immunité à médiation cellulaire**

L'IL12 produite par les cellules inflammatoires oriente précocement la réponse immunitaire spécifique vers un profil Th1 caractérisée par une production d'IL2, de TNF α et surtout d'IFN γ par les lymphocytes T CD4⁺, et par une réponse effectrice à médiation cellulaire (Yap et Sher, 1999).

Il est bien établi que les lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques sont les effecteurs majeurs de cette réponse cellulaire protectrice pendant la phase aiguë de l'infection. *In vivo*, la déplétion des lymphocytes T CD8⁺ entraîne le décès des animaux après l'infection (Shirahata *et al.*, 1994). Au contraire, le transfert de lymphocytes T CD8⁺ sensibilisés confère une résistance à l'infection (Khan *et al.*, 1994; Parker *et al.*, 1991). L'activité effectrice des lymphocytes T

CD8⁺ est liée à leur activité cytotoxique vis-à-vis des cellules infectées (Chardes *et al.*, 1994; Subauste *et al.*, 1991) et/ou à leur capacité de production d'IFN γ (Shirahata *et al.*, 1994).

Au cours de la phase aiguë de l'infection, les lymphocytes T CD4⁺ ont essentiellement un rôle de production de cytokines. La déplétion spécifique de cette sous-population lymphocytaire dans les premiers jours de l'infection ne modifie pas la survie des animaux (Shirahata *et al.*, 1994) car l'IFN γ est alors produit en grande quantité par les cellules NK (Denkers *et al.*, 1993; Schariton-Kersten et Sher, 1997). Les lymphocytes T CD4⁺ s'avèrent en revanche essentiels pour la transition vers la phase chronique de l'infection (Araujo, 1992) puis pour son contrôle à long terme en coopération avec les lymphocytes T CD8⁺ (Casciotti *et al.*, 2002; Gazzinelli *et al.*, 1992). Ils sont également impliqués dans le développement de l'immunité à médiation humorale (Johnson et Sayles, 2002).

Parallèlement au développement de la réponse protectrice Th1 se développe une composante régulatrice Th2 caractérisée par la production d'IL4, d'IL10, d'IL5 et de TGF β par les lymphocytes T. La régulation négative de la réponse Th1 par des cytokines Th2 permet d'éviter les phénomènes immunopathologiques liés à une réponse inflammatoire excessive (Mennechet *et al.*, 2004; Suzuki *et al.*, 2000).

- **Rôle des lymphocytes B et de l'immunité humorale**

Le rôle des lymphocytes B est moins clair. La résistance à l'infection est associée à une production massive d'anticorps spécifiques, majoritairement des IgG2a chez la souris. Ces anticorps persistent tout au long de la vie mais leur rôle reste controversé en raison du caractère intracellulaire de *T. gondii*.

In vitro, les anticorps dirigés contre les protéines SAG1, GRA2 et GRA6 bloquent l'entrée active du parasite dans les cellules (Cha *et al.*, 2001; Mineo *et al.*, 1993). *In vivo*, le transfert

passif d'anticorps spécifiques s'avère toutefois peu protecteur dans la majorité des modèles animaux de toxoplasmose aiguë (Foster et McCulloch, 1968; Nakayama, 1965; Pavia, 1986). Plus récemment, des études ont démontré l'implication des lymphocytes B dans la réponse protectrice. La souris μ MT, génétiquement déficiente en lymphocytes B, est plus sensible à l'infection aiguë que la souche sauvage correspondante malgré une production normale d'IFN γ et la présence de lymphocytes T CD8⁺ (Kang *et al.*, 2000). Dans ce modèle, le transfert de lymphocytes B sensibilisés (Chen *et al.*, 2003) ou d'anticorps spécifiques (Kang *et al.*, 2000) restaure la résistance à l'infection.

2. Rôle des cytokines

Le rôle des cytokines dans l'infection toxoplasmique a été extensivement étudié chez la souris, en particulier pendant la phase aiguë de l'infection. De ces nombreux travaux ressortent un certain nombre d'éléments consensuels.

- **Cytokines Th1**

- **L'IL12** est parmi les cytokines les plus précocement produites après l'infection, par les polynucléaires neutrophiles, les macrophages et les cellules dendritiques. Elle induit la différenciation des lymphocytes Th0 en lymphocytes Th1 ainsi que la production d'IFN γ par les lymphocytes Th1 et par les cellules NK. Son rôle est crucial dans les premiers jours de l'infection (Khan *et al.*, 1994; Sher *et al.*, 2003) mais également à plus long terme pour maintenir l'activité des lymphocytes T mémoires (Yap *et al.*, 2000). La quantité d'IL12 produite par les macrophages infectés par *T. gondii* a été reliée à la virulence de la souche parasitaire, les souches les plus virulentes (souches de type I) induisant la production la plus faible d'IL12 (Robben *et al.*, 2004).

- **L'IFN γ** est identifié depuis de nombreuses années comme la cytokine effectrice clé dans la résistance à l'infection (Suzuki *et al.*, 1988). Elle est produite à la fois par les cellules NK au cours de la réponse immunitaire non spécifique initiale puis par les lymphocytes Th1. Sa production est essentiellement sous la dépendance de l'IL12.

Les rôles de l'IFN γ dans l'infection toxoplasmique sont multiples (Subauste et Remington, 1991) : activation de l'activité toxoplasmicide des cellules phagocytaires et de certaines cellules non phagocytaires, activation des fonctions cytotoxiques des cellules NK et des lymphocytes T, augmentation de l'expression du CMH de classe II sur les cellules présentatrices d'antigène, commutation isotypique des immunoglobulines. Enfin, en ralentissant la réplication parasitaire, l'IFN γ pourrait participer à la transformation des tachyzoïtes en bradyzoïtes, donc à la transition vers la phase chronique de l'infection (Bohne *et al.*, 1993; Jones *et al.*, 1986), puis au maintien du parasite sous forme quiescente (Yano *et al.*, 2002).

A l'opposé de ces effets protecteurs, une production massive et non régulée d'IFN γ est délétère et conduit à des phénomènes immunopathologiques (Mennechet *et al.*, 2004; Mordue *et al.*, 2001; Suzuki *et al.*, 2000) et à des phénomènes apoptotiques massifs lors d'une infection par une souche parasitaire virulente de type I (Gavrilescu et Denkers, 2001).

- **L'IL2** est produite presque exclusivement par les lymphocytes Th1 activés. D'une manière générale, elle induit l'expansion clonale des lymphocytes T (Th1 et Th2) et B activés par un antigène et active les fonctions des cellules cytotoxiques. Chez la souris, l'administration d'IL2 recombinante prolonge la survie, diminue la charge parasitaire et augmente l'activité cytotoxique des cellules NK (Sharma *et al.*, 1985).

- **Cytokines Th2 régulatrices**

Chez le sujet immunocompétent, les cytokines Th2 ne sont pas décrites comme directement défavorables à l'hôte mais plutôt comme ayant un rôle de régulateur de la réponse Th1.

- **L'IL10** est produite par les lymphocytes Th2, les lymphocytes B et les macrophages. Elle joue un rôle immunomodulateur essentiel en régulant négativement la réponse Th1 et en évitant ainsi les phénomènes immunopathologiques liés à une hyperinflammation (Gazzinelli *et al.*, 1996). Cette activité immunosuppressive s'accompagne d'une diminution de l'activité toxoplasmicide des macrophages infectés (Gazzinelli *et al.*, 1992).

- **L'IL4** est essentiellement produite par les lymphocytes Th2 et, dans une moindre mesure, par les polynucléaires basophiles et les mastocytes. Elle induit la différenciation puis la prolifération des lymphocytes T indifférenciés vers un profil Th2, la prolifération des lymphocytes B et la commutation isotypique des immunoglobulines.

Son rôle apparaît défavorable pendant la phase aiguë de l'infection. En l'absence d'IL4, la survie des animaux infectés oralement est prolongée et les lésions intestinales sont réduites (Nickdel *et al.*, 2004; Villard *et al.*, 1995). Des résultats contradictoires ont été obtenus chez la souris génétiquement déficiente en IL4, montrant au contraire une sensibilité accrue à l'infection aiguë, liée à une réponse inflammatoire exacerbée (Roberts *et al.*, 1996).

Le rôle de l'IL4 apparaît très dépendant du modèle utilisé, notamment de la souche de souris naturellement susceptible ou résistante à l'infection et du degré de virulence de la souche parasitaire utilisée.

- **Le TGFβ** peut être produit par la quasi-totalité des cellules de l'organisme et en retour est capable d'inhiber la croissance de presque toutes les lignées cellulaires. Pendant la phase

aiguë de l'infection, il limite le développement de la réponse inflammatoire contrôlant la prolifération lymphocytaire (Mennechet *et al.*, 2004), en inhibant la production d'IFN γ par les cellules NK (Hunter *et al.*, 1995) et la production de TNF α par les macrophages (Langermans *et al.*, 2001). Au niveau intestinal, le TGF β est produit par les lymphocytes T intraépithéliaux recrutés par les chémokines libérées par les cellules infectées (Mennechet *et al.*, 2004).

- **Cytokines proinflammatoires**

Le TNF α , l'IL1, l'IL6 et l'IL18 sont produits par un grand nombre de types cellulaires pendant la réponse inflammatoire précoce. Ces cytokines sont impliquées à la fois dans la résistance et dans la susceptibilité à l'infection (Cai *et al.*, 2000; Chang *et al.*, 1990; Mordue *et al.*, 2001).

Le TNF α , en coopération avec l'IL12, stimule la production d'IFN γ par les cellules NK (Gazzinelli *et al.*, 1993) et, en coopération avec l'IFN γ , active les fonctions toxoplasmicides des macrophages (Langermans *et al.*, 1992).

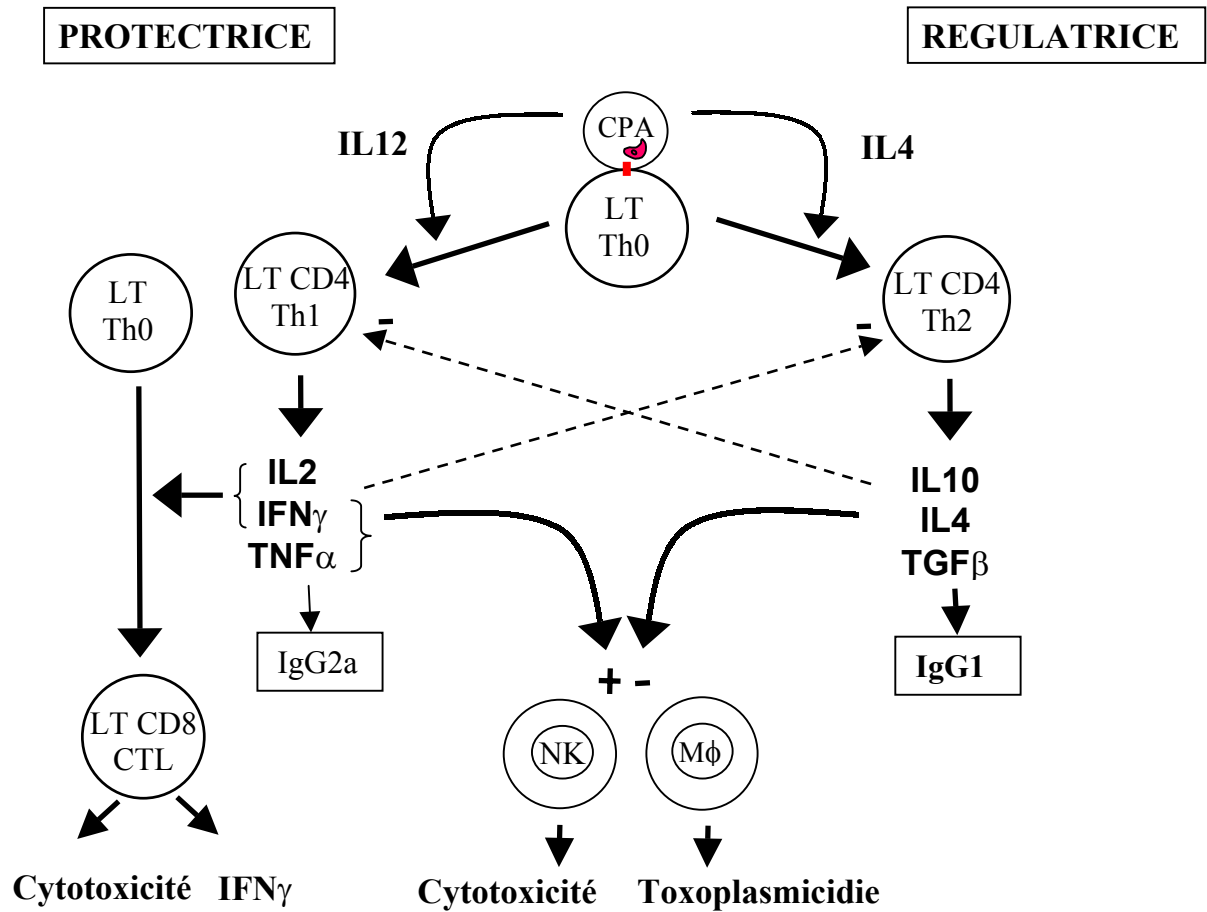
L'étude de la production et du rôle des cytokines au cours de l'infection toxoplasmique humaine est complexe. Les travaux se focalisent particulièrement sur l'encéphalite toxoplasmique et sur la toxoplasmose congénitale. Trois approches sont principalement utilisées : le dosage des cytokines *in vivo* dans le sang périphérique de sujets infectés, l'étude *ex vivo* de la production de cytokines par des cellules mononuclées sanguines stimulées par des antigènes toxoplasmiques et des études *in vitro* sur des cellules en lignée continue, notamment des cellules du système nerveux central.

Les résultats des études de production des cytokines proinflammatoires IL1, IL6 et TNF α sont contradictoires et paraissent dépendants du modèle utilisé. Yamamoto et coll. ont montré que les cellules mononuclées sanguines prélevées chez des sujets chroniquement infectés par *T. gondii* et stimulées *ex vivo* avec de l'antigène toxoplasmique produisent du TNF α et que cette

production est augmentée chez les patients présentant une chorioretinite toxoplasmique (Yamamoto *et al.*, 2000). *In vitro*, aucune production d'IL1, d'IL6 ou de TNF α n'a été mesurée après l'infection de cellules monocytaires THP1 (Friedland *et al.*, 1993), de cellules d'astrocytome (Pelloux *et al.*, 1994) par différentes souches de *T. gondii*. *In vitro*, le TNF α s'avère essentiel dans le contrôle de la réplication parasitaire dans divers types cellulaires (Beaman *et al.*, 1992; Canessa *et al.*, 1988; Chao *et al.*, 1993; Pelloux *et al.*, 1996). Le contrôle de la réplication parasitaire fait également intervenir l'IFN γ et l'un des mécanismes identifiés est l'activation de l'indoléamine 2,3-dioxygénase (Daubener *et al.*, 1995).

Les cytokines Th1, et en particulier l'IFN γ , ont été très étudiées. Des cellules sanguines mononuclées de sujets chroniquement infectés par *T. gondii* produisent de l'IL12, de l'IFN γ , et de l'IL2 après stimulation *ex vivo* avec des tachyzoïtes, de l'antigène toxoplasmique soluble ou de la protéine SAG1 (Canessa *et al.*, 1988; Daubener *et al.*, 1995; Fatoohi *et al.*, 2002; Gazzinelli *et al.*, 1995; Khan *et al.*, 1988; Yamamoto *et al.*, 2000). Chez les patients infectés par le VIH et présentant une encéphalite toxoplasmique, les concentrations d'IFN γ mesurées dans le sang périphérique sont faibles alors que des concentrations élevées sont mesurées pendant plusieurs mois chez les sujets immunocompétents (Canessa *et al.*, 1992) et la capacité de production d'IL12, d'IFN γ et d'IL2 par les cellules mononuclées sanguines stimulées *ex vivo* avec de l'antigène toxoplasmique est diminuée (Gazzinelli *et al.*, 1995). Chez les patients présentant une chorioretinite toxoplasmique, la capacité de production d'IFN γ et d'IL2 par les cellules mononuclées sanguines stimulées *ex vivo* avec de l'antigène toxoplasmique est diminuée (Yamamoto *et al.*, 2000). Chez la femme enceinte présentant une primo-infection toxoplasmique, Raymond et coll. ont observé une production d'IFN γ précoce (dès les premiers jours de l'infection) mais transitoire (disparition avec l'apparition des IgG spécifiques) dans le sang maternel puis dans le sang fœtal en cas de transmission du parasite au fœtus (Raymond *et al.*, 1990).

Figure 5. Réponse immunitaire spécifique.



CPA : Cellule présentatrice d'antigène.

NK : Cellule Natural Killer

M ϕ : Macrophage

3. Influence de la gestation sur la réponse immunitaire maternelle

- **Immunité placentaire**

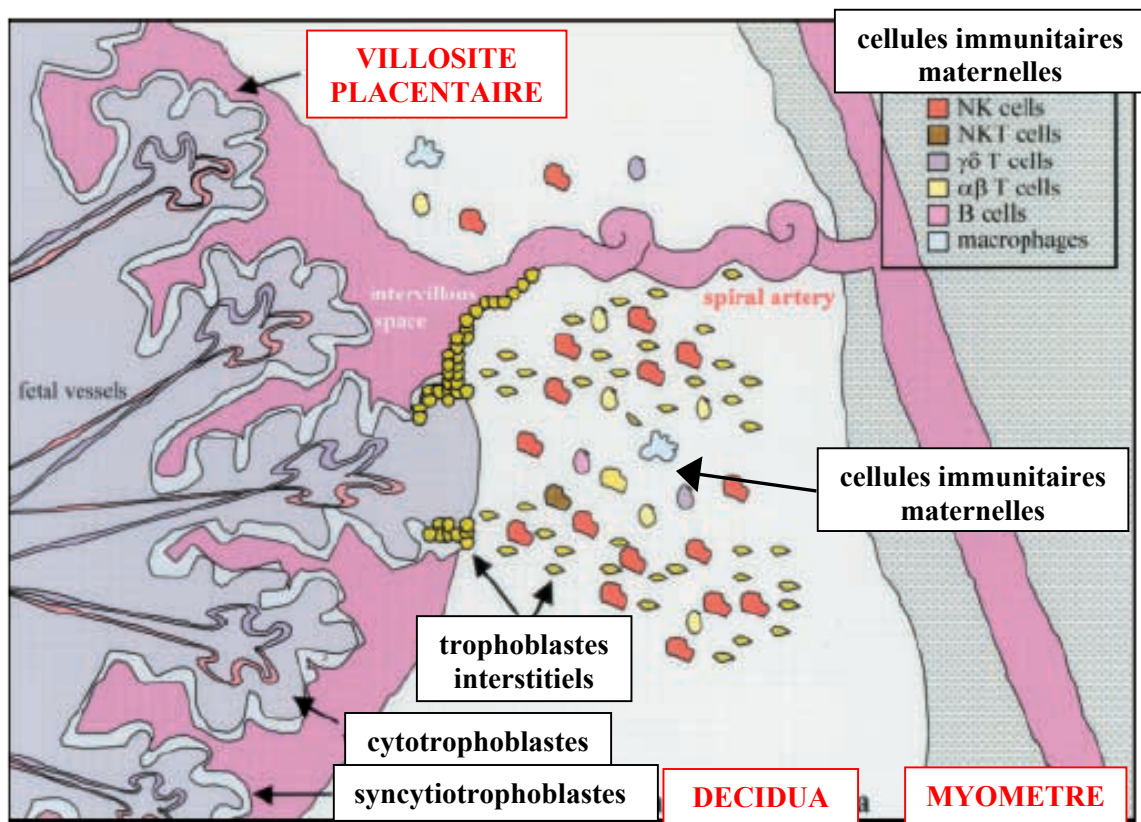
Le placenta constitue une barrière entre la circulation maternelle et la circulation fœtale (figure 6) (Huddleston et Schust, 2004). Il possède un double rôle immunologique en empêchant le rejet du fœtus par le système immunitaire maternel et en contrôlant la transmission verticale des microorganismes. Les villosités placentaires baignent dans les lacs sanguins maternels et assurent les échanges entre les circulations maternelle et fœtale. Elles sont bordées d'une double couche trophoblastique, le syncytiotrophoblaste externe et le cytotrophoblaste interne, et contiennent les vaisseaux fœtaux, du tissu conjonctif et des macrophages. Des cellules cytotrophoblastiques migrent dans la decidua pour former le trophoblaste interstitiel qui interagit avec les cellules de l'immunité maternelle présentes dans la decidua. Le trophoblaste villositaire n'exprime aucune molécule du CMH. Le trophoblaste interstitiel exprime des molécules du CMH I classique et du CMH non classique (chez l'homme, il s'agit des molécules HLA-C classiques et HLA-G et E non classiques) qui inhibent l'activité des cellules NK cytotoxiques (Moffett-King, 2002). Les cellules trophoblastiques sont capables de phagocyter des microorganismes et produisent des concentrations importantes de dérivés nitrés et oxygénés (Guilbert *et al.*, 1993). Elles sécrètent des cytokines qui contribuent à l'orientation Th2 du placenta (Lin *et al.*, 1993). La decidua contient également 40% de cellules immunitaires maternelles, majoritairement des cellules de l'immunité non spécifique, cellules NK et NKT, macrophages, ainsi que moins de 5% de lymphocytes B et de lymphocytes $T\alpha\beta$ et $\gamma\delta$ (Huddleston et Schust, 2004). Le nombre des cellules NK déciduales augmente au début de gestation puis décroît progressivement au cours de la seconde moitié de la gestation (Paffaro *et al.*, 2003; Trundley et Moffett, 2004). Elles sont constituées d'une population particulière, les cellules NK utérines ou uNK qui migrent de la moelle osseuse vers le placenta dès le début de la gestation. Leur phénotype

diffère de celui des cellules NK circulantes par une expression accrue du CD56 et par l'absence de CD16 (King *et al.*, 1991). Elles contiennent de nombreux granules sécrétoires riches en perforine-granzymes et sécrètent différentes chémokines et cytokines dont l'IL4 et l'IFN γ (Ashkar et Croy, 1999; Trundley et Moffett, 2004). Le profil sécrétoire des lymphocytes T est rapidement orienté vers un phénotype Th2 par les hormones, notamment par la progestérone et par l'IL4 sécrétée par les cellules NK, TNK (Dang *et al.*, 2000) et les cellules dendritiques (Iwasaki et Kelsall, 1999). Cet environnement Th2 est encore renforcé par la production d'IL10 par les macrophages (Lidstrom *et al.*, 2003) et les cellules dendritiques (Iwasaki et Kelsall, 1999). Le placenta baigne donc dans un environnement Th2 avec une production locale d'IL4, d'IL10 et de TGF β (Lin *et al.*, 1993) et cet environnement Th2 est strictement nécessaire au maintien de la gestation et une réorientation vers un environnement Th1 est associé à une fréquence accrue de résorption foetale (Chaouat *et al.*, 1995; Tangri et Raghupathy, 1993)

- **Influence de la gestation sur la réponse immunitaire maternelle**

Les nombreuses connaissances concernant la réponse immunitaire à l'infection toxoplasmique acquise en dehors de la gestation ne peuvent pas être simplement extrapolées car, sous l'action des hormones, la balance Th1/Th2 est modifiée (Lin *et al.*, 1993; Wegmann *et al.*, 1993). L'environnement Th2 nécessaire à la grossesse régule négativement la réponse Th1 et augmente la susceptibilité aux microorganismes intracellulaires, donc au toxoplasme (Luft et Remington, 1982; Thouvenin *et al.*, 1997). Malgré ce déséquilibre théoriquement défavorable, l'existence d'une réponse immunitaire spécifique acquise avant la gestation protège le fœtus en cas de réinfection et bloque totalement la transmission verticale du parasite. Les mécanismes protecteurs de cette réponse ne sont pas clairement identifiés et doivent donc faire l'objet d'études spécifiques.

Figure 6. Structure du placenta d'après (Huddleston et Schust, 2004).



V. VACCINATION CONTRE LA TOXOPLASMOSE : SITUATION DE LA QUESTION

Le développement d'un vaccin contre la toxoplasmose a fait l'objet de très nombreux travaux. Trois approches sont développées, utilisant des vaccins vivants (souches mutées), des vaccins sous-unitaires protéiques ou peptidiques et plus récemment, des vaccins ADN. La plupart des études se sont intéressées à la prévention de l'infection acquise en dehors de la gestation. Peu d'études concernent la toxoplasmose congénitale pour laquelle la physiopathologie est encore mal connue et les modèles expérimentaux délicats à mettre en œuvre.

1. Vaccins vivants

Les souches vaccinales sont des souches vivantes mutées de *T. gondii*. Trois souches sont développées pour leur intérêt scientifique et leurs applications vétérinaires.

- **Souche ts4**

Elle dérive par mutagenèse chimique de la souche hautement virulente de type I RH (Pfefferkorn et Pfefferkorn, 1976). C'est une souche non kystogène qui ne se multiplie pas *in vitro* à 40°C et qui ne persiste que quelques semaines dans l'organisme. Chez la souris, l'immunisation avec la souche ts4 confère une excellente protection vaccinale. Elle permet la survie des animaux après infection par une souche virulente létale de *T. gondii* (Gazzinelli *et al.*, 1991) et réduit significativement le nombre de kystes dans le cerveau après infection orale avec une souche avirulente de *T. gondii* (McLeod *et al.*, 1988). La vaccination induit une réponse Th1 et la protection est médiée par les lymphocytes T CD8⁺ et par l'IFN γ . La transmission maternofoetale du parasite n'est pas modifiée après immunisation par voie sous-cutanée mais est réduite de 30% après immunisation par voie intestinale (McLeod *et al.*, 1988). La souche ts4 s'avère néanmoins virulente et pathogène en cas d'immunosuppression,

même modérée (Sayles et Johnson, 1996), ainsi que pendant la gestation, avec une transmission possible au fœtus (Escajadillo et Frenkel, 1991). Elle n'est plus utilisée aujourd'hui que pour étudier les mécanismes de la réponse immunitaire protectrice.

- **Souche S48**

C'est une souche de tachyzoïtes initialement isolée en Nouvelle-Zélande à partir d'un fœtus ovin infecté, et atténuée par 3000 passages chez la souris (Buxton et Innes, 1995). La souche atténuée n'a plus la capacité de former des kystes et est éliminée de l'organisme en quelques semaines après une brève phase de multiplication. Un vaccin ovin (Toxovax®) destiné à réduire les avortements chez le mouton est commercialisé en Nouvelle-Zélande depuis 1988 et en Europe depuis 1992. Ce vaccin réduit de 75% le nombre d'avortements et la mortalité néonatale mais la durée de la protection n'excède pas 3 ans.

- **Souche T263**

C'est une souche incomplète qui forme des kystes mais ne possède pas de cycle sexué (Frenkel *et al.*, 1991). Elle est à l'étude pour le développement d'un vaccin chez le chat. L'administration orale de bradyzoïtes T263 induit une réponse immunitaire qui, lors d'une infection, empêche la transition vers le cycle sexué et donc la formation des oocystes (Freyre *et al.*, 1993).

L'utilisation des souches vivantes mutées n'est pas envisageable chez l'homme en raison du risque de réversion de virulence, notamment en cas d'immunosuppression. Les études se sont donc orientées vers l'utilisation d'antigènes parasitaires.

2. Vaccins sous-unitaires et vaccins ADN

Les premières études ont utilisé des mélanges antigéniques complexes obtenus par sonication de tachyzoïtes ou de kystes. Une protection partielle en terme de survie et de charge parasitaire cérébrale a été obtenue en associant ces mélanges antigéniques avec de la toxine cholérique (Bourguin *et al.*, 1993), de l'IL12 (Yap *et al.*, 1998) ou des liposomes (Elsaid *et al.*, 1999). Aucune différence n'a été observée entre les antigènes des tachyzoïtes et des bradyzoïtes (Elsaid *et al.*, 1999).

Depuis quelques années, l'étude de la structure moléculaire de *T. gondii* permet d'identifier et de localiser progressivement les protéines des trois stades parasitaires. Ces nouvelles connaissances orientent aujourd'hui le développement d'un vaccin humain vers une approche sous-unitaire protéique ou ADN. Les travaux publiés à ce jour portent presque exclusivement sur des vaccinations monoprotéines. Ils sont le prérequis indispensable pour préciser l'activité de chaque candidat vaccin avant de tester des combinaisons protéiques ayant des activités complémentaires et élargies.

La très grande majorité des études porte sur la toxoplasmose acquise en dehors de la gestation et utilisent une voie vaccinale soit parentérale (intrapéritonéale, sous-cutanée ou intradermique) soit intranasale ou entérale dans le but d'induire une réponse muqueuse capable de bloquer l'invasion parasitaire localement, dès la contamination.

- **Protéines de surface**

La protéine SAG1 est le candidat vaccin le plus étudié. Cette protéine de 30 kDa, purifiée en 1983 (Kasper *et al.*, 1983) et dont le gène a été cloné en 1988 (Burg *et al.*, 1988), est la protéine la plus abondante du parasite. Présente exclusivement sur les tachyzoïtes et très

conservée entre les souches (Windeck et Gross, 1996), SAG1 est un antigène de surface majeur du parasite qui stimule à la fois les réponses humorale et cellulaire. Chez l'homme, elle induit des titres élevés d'anticorps et est reconnue par 100% des sérums de sujets en phase aiguë ou chronique de l'infection (Potasman *et al.*, 1986). *Ex vivo*, elle induit une prolifération lymphocytaire T et une production d'IFN γ par des lymphocytes périphériques provenant d'individus chroniquement infectés (Khan *et al.*, 1988).

Plusieurs essais vaccinaux ont été réalisés avec la protéine purifiée ou recombinante ainsi qu'avec des peptides dérivés de SAG1. Les principales études de vaccination avec SAG1 sont détaillées dans le tableau 1. L'étude princeps a montré un effet délétère de la vaccination, vraisemblablement lié à un effet Th2 inducteur de l'adjuvant choisi (Kasper *et al.*, 1985). Les études ultérieures ont associé SAG1 avec divers adjuvants Th1 inducteurs et, malgré des protocoles expérimentaux très variés, ont mis en évidence une protection significative mais partielle en terme de survie et de charge parasitaire cérébrale (Bonenfant *et al.*, 2001; Bulow et Boothroyd, 1991; Debard *et al.*, 1996; Khan *et al.*, 1991; Letscher-Bru *et al.*, 1998). Cette protection est corrélée à une réponse Th1 médiée par des lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques (Kasper *et al.*, 1992; Khan *et al.*, 1988) et est transférable par le biais de cette sous-population lymphocytaire (Khan *et al.*, 1991; Khan *et al.*, 1994). En revanche, la protéine seule, sans adjuvant, n'a pas (Khan *et al.*, 1991; Letscher-Bru *et al.*, 1998) ou peu d'effet protecteur (Bonenfant *et al.*, 2001; Bulow et Boothroyd, 1991).

Deux peptides synthétiques dérivés de SAG1 ont été évalués en combinaison avec de l'adjuvant de Freund. Une construction octamérique d'un peptide de 20 acides aminés correspondant à l'extrémité N-terminale de la protéine a permis de prolonger significativement la survie des animaux (Darcy *et al.*, 1992). La protection était transférable

par les lymphocytes T à des rats Nude ce qui suggère que le peptide utilisé contient un épitope T. En revanche, les anticorps induits par le peptide ne reconnaissaient pas la protéine SAG1 native. Un second peptide correspondant aux acides aminés 125 à 165 s'est avéré protecteur chez la souris CBA/J avec une réponse Th1 mais non protecteur chez la souris C57BL/6 chez laquelle il induisait une réponse Th2 (Velge-Roussel *et al.*, 1997).

Plus récemment la protéine SAG1 a été administrée sous forme de vaccin ADN, seule (Couper *et al.*, 2003; Nielsen *et al.*, 1999) ou associée à un gène adjuvant, l'IL2 (Chen *et al.*, 2002) ou le GM-CSF (Angus *et al.*, 2000). Dans tous les cas, l'immunisation induisait une réponse immunitaire à la fois cellulaire et humorale mais la protection obtenue était variable selon le modèle.

Les protéines SAG2 et SRS1 recombinantes, également spécifiques du tachyzoïte, se sont elles aussi avérées protectrices, permettant d'éradiquer l'infection chez respectivement 17 et 25% des animaux infectés par une dose létale de bradyzoïtes (Mishima *et al.*, 2001).

- **Protéines GRA**

Ces protéines sont reconnues par les anticorps produits pendant la phase aiguë et pendant la phase chronique de l'infection. Une protection vaccinale significative mais toujours partielle a été obtenue récemment avec la protéine recombinante GRA4 associée à de l'alun (Martin *et al.*, 2004) et avec les gènes de GRA1, GRA4 et GRA7 (Martin *et al.*, 2004; Scorza *et al.*, 2003; Vercammen *et al.*, 2000). Pour GRA1, la protection était médiée par les lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques et spécifiquement transférable par ces cellules (Scorza *et al.*, 2003).

- **Protéines MIC**

Seule la protéine MIC3 a été évaluée sous forme de vaccin ADN (Ismael *et al.*, 2003). La vaccination induit une réponse Th1 et réduit la charge parasitaire cérébrale en infection chronique.

- **Protéines ROP**

Les résultats obtenus jusqu'alors avec ROP2 sous forme de protéine recombinante associée à de l'alun (Martin *et al.*, 2004) ou sous forme de plasmide (Leyva *et al.*, 2001; Vercammen *et al.*, 2000) sont contradictoires et très dépendants du modèle utilisé, notamment du fond génétique des animaux. La majorité des résultats va néanmoins dans le sens d'une absence de protection ou d'une protection minime associée à une réponse immunitaire Th2 ou mixte Th1 et Th2.

Ces nombreux travaux de vaccination débutés dans les années 80 avec des souches vivantes de toxoplasme, avec des mélanges antigéniques puis des protéines purifiées ou recombinantes ont permis de mieux comprendre les mécanismes de la réponse immunitaire protectrice au toxoplasme. Toutefois, à l'exception de la souche ts4 qui confère une protection totale dans la plupart des modèles, toutes les approches vaccinales utilisées jusqu'alors ne protègent que partiellement malgré l'utilisation de divers adjuvants. La combinaison de plusieurs protéines, de protéines et de plasmides ou l'association de plusieurs voies vaccinales pourrait permettre d'améliorer l'efficacité de la vaccination.

Tableau 1. Descriptif des principales études de vaccination avec SAG1

Tableau 1A. Protéine SAG1 purifiée

Nature du vaccin		Modèle				Résultat	Référence
SAG1	Adjuvant	Souris	Immunisation	Infection			
Purifiée	Enterotoxines thermolabiles de <i>E. coli</i>	CBA/J	10µg SAG1 + 1µg toxine i.n. à J0 et J28	10 K souche 76K p.o. à J42	TC	↘ kystes cérébraux (- 73%)	(Bonenfant <i>et al.</i> , 2001)
Purifiée	Liposomes	Outbred Swiss	1µg SAG1 i.p. à J0 et J14	10 ⁵ Tz souche C i.p. à J28	TA	↗ survie à 30j (93% vs 27%)	(Bulow <i>et al.</i> , 1991)
Purifiée	Toxine cholérique	CBA/J	10µg SAG1 + 0,5µg toxine i.n. à J0 et J28	100K souche 76K p.o. à J42	TC	↘ kystes cérébraux (- 80%)	(Debard <i>et al.</i> , 1996)
Purifiée	Freund	BALB/c	0,5µg SAG1 i.p. ou s.c. 3x/sem. pdt 3 sem.	DL50 K souche C i.p. à J33	TA	↗ mortalité	(Kasper <i>et al.</i> , 1985)
Purifiée	Quil A	CD1 A/J C57BL/6	0,125µg SAG1 + 1,9µg Quil A s.c. 2x/sem. pdt 2 sem.	DL90 K souche P p.o. à J21	TA	↗ survie à 6 sem. CD1 : 90% vs 0% A/J : 67% vs 0% C57 : 33% vs 0%	(Khan <i>et al.</i> , 1991)
				Survivants de TA	TC	↘ kystes cérébraux chez les survivants	

Voies d'administration : i.n. = intranasale; i.p. = intrapéritonéale; s.c. = sous-cutanée; p.o. = orale

Infection : TA = toxoplasmose aiguë; TC = toxoplasmose chronique. K = kystes; Tz = tachyzoïtes. DL = dose léthale.

Tableau 1B. Protéine SAG1 recombinante et peptides synthétiques

Nature du vaccin		Modèle				Résultat	Référence
SAG1	Adjuvant	Souris	Immunisation	Infection			
Recomb. <i>E. coli</i>	IL12	CBA/J	1µg SAG1 + 1µg IL12 s.c. 2x/sem. pdt 2 sem.	20 K souche PRU p.o. à J45	TC	↘ kystes cérébraux (- 40%)	(Letscher-Bru <i>et al.</i> , 1998)
Recomb. <i>E. coli</i>	Alun	Outbred NMRI	20µg SAG1 + 0,5µg alun à J0, J14, J28 et J42	10 ⁵ Tz souche RH i.p. à J90	TA	↗ survie à 12j (45% vs 20%)	(Petersen <i>et al.</i> , 1998)
Peptide synthétique 48-67 en construction octamérique	Freund incomplet puis complet	Outbred OF1	25µg peptide s.c. à J0, J20, J28 et J35	1200 K souche 76K p.o. à J42	TA	↗ survie à 75j (40% vs 10%)	(Darcy <i>et al.</i> , 1992)
Peptide synthétique 125-165	Freund incomplet puis complet	CBA/J C57BL/6	20µg peptide s.c. à J0 et J28	100 K souche 76K p.o. à J42	TC	CBA/J : ↘ kystes cérébraux (- 40%) C57BL/6 : pas de protection	(Velge- Roussel <i>et al.</i> , 1997)

Voies d'administration : i.p. = intrapéritonéale; s.c. = sous-cutanée; p.o. = orale

Infection : TA = toxoplasmose aiguë; TC = toxoplasmose chronique. K = kystes; Tz = tachyzoïtes

Tableau 1C. Vaccin SAG1 ADN

Nature du vaccin		Modèle				Résultat	Référence
SAG1	Adjuvant	Souris	Immunisation	Infection			
Plasmide	GM-CSF	C57BL/6	100µg SAG1 + 50µg GM-CSF i.m. à J0, J21 et J42	10 ³ Tz RH i.p. à J56	TA	Pas de protection	(Angus <i>et al.</i> , 2000)
				80 K ME49 p.o. à J56	TA	↗ survie à 12 sem. (100% vs 50%)	
				20 K ME49 p.o. à J56	TC	↘ kystes cérébraux (- 71%)	
Plasmide	IL2	NIH	100µg SAG1 + 100µg IL2 i.m. à J0, J21 et J42	200 Tz souche RH i.p. à J56	TA	↗ médiane survie (12j vs 6j)	(Chen <i>et al.</i> , 2002)
Plasmide	/	BALB/c	50µg SAG1 i.m. à J0 et J21	20 K souche Beverley p.o. à J35	TA	↗ survie à 30 j (67% vs 25%)	(Couper <i>et al.</i> , 2003)
				10 K souche Beverley p.o. à J35	TC	Absence de kystes cérébraux	
Plasmide	/	BALB/c C3H	50µg SAG1 i.m. à J0 et J21	10 ⁵ Tz souche RH i.p. à J35	TA	↗ survie à 20 j BALB/c : 80% vs 20% C3H : 100% vs 30%	(Nielsen <i>et al.</i> , 1999)

Voies d'administration : i.m. = intramusculaire; i.p. = intrapéritonéale; p.o. = orale

Infection : TA = toxoplasmose aiguë; TC = toxoplasmose chronique. K = kystes; Tz = tachyzoïtes

A côté de ces nombreux travaux portant sur la prévention de l'infection acquise en dehors de la gestation, seules quelques d'études se sont intéressées directement à la prévention vaccinale de la toxoplasmose congénitale humaine, alors même qu'un vaccin vétérinaire est commercialisé depuis plusieurs années. Ces études se heurtent à la difficulté d'établir des modèles animaux appropriés comparables à l'infection humaine et au manque de connaissance des mécanismes qui empêchent la transmission maternofoetale du parasite chez la femme immunisée avant la grossesse.

Les premières études animales ont montré une efficacité variable avec la souche vivante mutée ts4 (McLeod *et al.*, 1988), avec des mélanges complexes d'antigènes solubles de tachyzoïtes inclus dans des véhicules lipidiques (Elsaid *et al.*, 2001; Roberts *et al.*, 1994) ou d'antigènes excrétés-sécrétés (Zenner *et al.*, 1999).

Plus récemment, trois études ont évalué la protéine SAG1 sous forme recombinante (Haumont *et al.*, 2000; Letscher-Bru *et al.*, 2003) et sous forme de plasmide (Couper *et al.*, 2003) dans des modèles de toxoplasmose congénitale chez le cobaye et chez la souris. Les résultats sont contradictoires, montrant, selon le modèle utilisé, une diminution, une stabilité ou une augmentation du pourcentage de transmission parasitaire. Ces études sont détaillées dans le tableau 2.

Tableau 2. Descriptif des études de vaccination avec SAG1 dans des modèles de toxoplasmose congénitale

Nature du vaccin		Modèle			Résultat	Référence
SAG1	Adjuvant	Animaux	Immunisation	Infection		
Recomb. <i>Pichia pastoris</i>	SBAS1	Cobaye	10µg SAG1 + SBAS1 s.c. à J0, sem4 et sem8	10 ⁵ Tz souche C56 i.d. 18 sem. après la 1 ^{ère} immunisation, = à la 7/9 ^{ème} sem. de gestation	PROTECTION ↘ nb nouveau-nés vivants infectés (- 59% à - 84%)	(Haumont <i>et al.</i> , 2000)
Recomb. <i>E. coli</i>	/	Souris : CBA/J BALB/c	1µg SAG1 s.c. 2x/sem. pdt 2 sem.	20 K souche ME49 p.o. 45 jours après la 1 ^{ère} immunisation = au 12/20 ^{ème} jour de gestation	<u>CBA/J</u> : DELETARE ↗ nb fœtus infectés à J19 de gestation (+ 50%) <u>BALB/c</u> : PROTECTION ↘ nb fœtus infectés à J19 de gestation (- 50%)	(Letscher-Bru <i>et al.</i> , 2003)
Plasmide	/	Souris BALB/c	50µg SAG1 i.m. à J0 et J21	10 K souche Beverley p.o. 7 sem. après la 1 ^{ère} immunisation = au 12/20 ^{ème} jour de gestation	PAS DE PROTECTION Nb nouveau-nés vivants infectés non modifié par la vaccination	(Couper <i>et al.</i> , 2003)

Voies d'administration : i.d. = intradermique; s.c. = sous-cutanée; p.o. = orale; i.p. = intrapéritonéale
Infection : K = kystes; Tz = tachyzoïtes

OBJECTIFS

Chez la femme immunocompétente, l'immunité induite par une infection contractée avant la grossesse empêche le passage transplacentaire du toxoplasme et protège complètement le fœtus en cas de réinfection, ce qui suggère qu'il est possible de bloquer la transmission verticale du parasite par une vaccination appropriée avant la gestation.

L'utilisation de souches vaccinales vivantes de toxoplasme n'étant pas envisageable chez l'homme, le développement d'un vaccin humain doit s'orienter vers une approche sous-unitaire protéique ou ADN. L'identification progressive des antigènes de *T. gondii* permet aujourd'hui de développer cette approche. La protéine de surface SAG1 du parasite est le candidat vaccin le mieux caractérisé et a démontré son efficacité dans plusieurs modèles de toxoplasmose acquise en dehors de la gestation (Angus *et al.*, 2000; Bonenfant *et al.*, 2001; Bulow et Boothroyd, 1991; Chen *et al.*, 2002; Couper *et al.*, 2003; Debard *et al.*, 1996; Khan *et al.*, 1991; Letscher-Bru *et al.*, 1998; Nielsen *et al.*, 1999). Les études de vaccination dans des modèles de toxoplasmose congénitale sont encore peu développées, principalement à cause de la difficulté d'établir des modèles animaux comparables à l'infection humaine.

Les objectifs de notre travail sont, dans un premier temps, d'évaluer les propriétés vaccinales de la protéine SAG1 de *T. gondii* dans un modèle de toxoplasmose congénitale chez la souris, puis de caractériser les mécanismes immunologiques humoraux et cellulaires maternels qui sous-tendent la protection vaccinale observée. Au cours de la gestation, l'équilibre Th1/Th2 est modifié et une réponse Th1 excessive est préjudiciable au bon déroulement de la gestation. Pour cette raison, et bien que la plupart des études réalisées en dehors de la gestation aient utilisé des adjuvants Th1, nous avons choisi de travailler avec la protéine seule, sans adjuvant, afin de bien définir dans un premier temps les propriétés immunomodulatrices de la protéine SAG1 dans le contexte de la gestation.

MATERIEL ET METHODES

I. MATERIEL

1. Animaux

Des souris congéniques BALB/c JRJ (H2^d) et CBA/J (H2^k) sont utilisées pour le protocole vaccinal et le modèle de toxoplasmose congénitale. Des souris SWISS non congéniques sont utilisées pour l'entretien des souches parasitaires et pour la subinoculation des fœtus et placentas. Les animaux proviennent du CERJ (Le Genest StIsle) et sont âgés de 8 à 12 semaines au début de l'expérimentation.

En fin d'expérimentation, les animaux sont euthanasiés à l'isoflurane (Forène®, Abbott France, Rungis).

2. Souches parasitaires

Des kystes de la souche de virulence modérée ME49 (souche kystogène de type II) de *T. gondii* sont utilisés pour l'infection orale. La souche est entretenue chez des souris SWISS par passages successifs de 20 kystes par voie orale tous les 6 mois. Pour la préparation des kystes, les cerveaux des animaux sont prélevés à partir de la quatrième semaine postinfection et broyés dans du PBS stérile en broyeur en verre. Les kystes sont ensuite dénombrés au microscope.

Des tachyzoïtes de la souche RH sont utilisés pour des tests *in vitro* et pour la préparation de l'antigène soluble toxoplasmique (AST). La souche est entretenue chez des souris SWISS par passages successifs de 10⁶ tachyzoïtes par voie intrapéritonéale tous les 4 jours. Les tachyzoïtes sont récupérés par lavage de la cavité péritonéale avec 2x5 ml de PBS stérile puis lavés 3 fois avec du PBS stérile.

3. Antigènes parasitaires

L'AST est préparé à partir des tachyzoïtes de souche RH. Les tachyzoïtes sont incubés 30 minutes à 37°C dans une solution à 2,5% de trypsine (Sigma, St Louis, USA), filtrés sur membrane de porosité 3 µm, lavés 3 fois avec du PBS stérile puis soumis aux ultrasons 2x10 minutes à 4°C. La concentration en protéines est mesurée par la technique de Bradford au bleu de Coomassie (réactifs Bio-Rad, Hercules, USA).

La protéine SAG1 nous est gracieusement fournie par le Dr. E. Petersen (Laboratoire de Biologie Moléculaire, Statens Seruminstitut, Copenhage, Danemark). Il s'agit d'une protéine recombinante produite en *Escherichia coli*. L'absence de LPS est vérifiée sur chaque lot par le Laboratoire Octapharma (Illkirch-Graffenstaden).

4. Production des anticorps monoclonaux

Les anticorps monoclonaux anti-IFN γ (IgG1 de rat anti-souris, clone XMG-1.2) et anti-CD8 (IgG2a de rat anti-souris, clone H35) sont produits au laboratoire à partir d'hybridomes gracieusement mis à disposition par Madame Buzoni-Gatel.

- Conservation des hybridomes

En dehors des cycles de production des anticorps, les hybridomes sont conservés en azote liquide dans un milieu cryoprotecteur contenant 50% de sérum de veau fœtal inactivé (SVFi) (Gibco BRL, Grand Island, USA), 30% de milieu RPMI 1640-Glutamax® (Gibco) et 20% de DMSO.

- Production des anticorps

Les hybridomes sont cultivés en milieu RPMI 1640-Glutamax® additionné de 10% de SVFi (milieu complet) avec ou sans antibiotiques (Gibco) (pénicilline 50 UI/ml, streptomycine 50

µg/ml, amphotéricine B 1 µg/ml), à 37°C sous 5% de CO₂ et en atmosphère saturée en humidité.

Décongélation et mise en culture : un nouvel aliquot est décongelé pour chaque cycle de production. Les cellules sont rapidement décongelées à 37°C et mises en culture en plaques de 24 puits (Nunc, Roskild, Danemark) dans du milieu complet additionné d'antibiotiques et de 1,5 ng/ml d'IL6 recombinante murine (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA) pour stimuler la reprise de la croissance cellulaire et la production des anticorps. Les cellules sont divisées et repiquées 2 fois par semaine dans le même milieu jusqu'à l'obtention d'une croissance active et régulière.

Production des cellules : pour obtenir une quantité suffisante de cellules en phase exponentielle de croissance et avec une viabilité supérieure à 80%, les cellules sont d'abord placées pendant 8 jours en flasques de 75 cm² (Nunc) (1,5 ml de suspension cellulaire dans 20 ml de milieu complet sans antibiotiques). Ceci permet d'obtenir une suspension contenant 5x10⁵ à 1x10⁶ cellules viables par ml de milieu.

Production des anticorps : les cellules sont alors placées en flasques de 175 cm² (Nunc), à raison de 5x10⁶ cellules dans 100 ml de milieu complet sans antibiotique et incubées 10 à 12 jours, jusqu'à obtenir 90 % de mortalité cellulaire. Les cultures sont ensuite centrifugées 10 minutes à 300 g. Les surnageant sont filtrés sous vide sur membrane de porosité 0,22 µm, poolés par 500 ml et stockés à 4°C pendant 48 heures maximum.

- **Concentration et purification des anticorps**

Le surnageant est concentré 20 fois par dialyse en boudins de 500 ml contre du PEG 20000 (Sigma) à 4°C puis filtré sur membrane de porosité 0,22 µm. Les anticorps monoclonaux sont ensuite purifiés sur des colonnes d'affinité HiTrap™ protein G (Amersham Biosciences Europe, Orsay) suivant les recommandations du fabricant. Brièvement, le surnageant

concentré est passé sur les colonnes de sépharose-protéine G, préalablement équilibrées avec du tampon phosphate de sodium 20 mM pH 7, qui fixent les anticorps par leur fragment Fc. Les colonnes sont lavées avec du tampon phosphate de sodium 20 mM pH 7 jusqu'à obtention d'un éluat limpide. Les anticorps sont ensuite élués par fractions de 1 ml avec 10 ml de tampon glycine-HCl 0,1 M pH 2,7 et recueillis dans un tampon de neutralisation Tris-HCl 1 M pH 9.

- Dosage spectrophotométrique des anticorps

Un dosage spectrophotométrique des anticorps est réalisé à 280 nm sur chaque fraction éluee et la concentration (c) est calculée : $c \text{ (mg/ml)} = DO_{280} / E.l$

E : coefficient d'extinction molaire des IgG (1,43 pour 1 mg/ml)

l : longueur du trajet optique (1 cm)

Les fractions contenant au moins 10 µg/ml d'IgG sont poolées et le pH est ajusté à pH 7,2.

Le rendement de production est de 7 à 9 mg d'IgG par litre de culture.

- Conservation des anticorps monoclonaux

Les anticorps sont concentrés à 2,5 mg/ml par dialyse contre du PEG 20000 puis filtrés sur membrane de porosité 0,22 µm. Ils sont conservés en aliquots de 500 µg à -80°C jusqu'à leur utilisation.

5. Préparation des fragments Fab des anticorps

Les fragments Fab sont préparés par clivage d'IgG monoclonales par la papaïne avec le système ImmunoPure® Fab Preparation Kit (Pierce, Rockford, USA) suivant les recommandations du fabricant.

- Préparation des fragments Fab

Pour l'étape de digestion enzymatique, 1 ml de solution d'IgG à 5 mg/ml dans du tampon phosphate de sodium supplémenté extemporanément avec 3,5 mg/ml de cystéine-HCl (pH 7) est incubé pendant une nuit au bain-marie à 37°C et sous agitation avec 0,25 ml de papaïne fixée sur des billes d'agarose.

- Purification des fragments Fab

L'échantillon digéré est passé sur une colonne d'affinité portant de la protéine A (AffinityPak™ Immobilized Protein A Column), préalablement équilibrée avec un tampon de fixation des IgG (ImmunoPure® IgG Binding Buffer), qui fixe les fragments Fc libres résultant de la digestion ainsi que les IgG non clivées. La fraction non fixée qui contient les fragments Fab est recueillie. La colonne est lavée avec du tampon de fixation des IgG et les produits de lavage de la colonne sont ajoutés à la fraction non fixée initiale. La colonne est régénérée avec 10 ml de tampon acide citrique 0,1 M pH 3 et saturée avec 10 ml d'eau distillée stérile contenant 0,02% d'azide de sodium avant d'être bouchée et stockée à 4°C.

- Dosage spectrophotométrique des fragments Fab

Un dosage spectrophotométrique est réalisé à 280 nm et la concentration (c) est calculée :

$$c \text{ (mg/ml)} = DO_{280} / E.l$$

E : coefficient d'extinction molaire des fragments Fab (1,53 pour 1 mg/ml)

l : longueur du trajet optique (1 cm)

- Analyse des fragments obtenus

La présence des fragments Fab et la pureté de la préparation sont vérifiées par électrophorèse en gel de polyacrylamide SDS-PAGE. Quinze microlitres d'échantillon contenant 3 µg de protéines diluées dans du tampon de Laemmli (Bio-Rad) et 5 µl de marqueurs de poids moléculaire s'échelonnant de 14,4 à 200 kDa (Bio-Rad) sont déposés dans les puits du gel

(Ready Gels 4-15%, Bio-Rad). La migration se fait à 200 V pendant 60 min dans du tampon Tris 25 mM, glycine 192 mM, SDS 0,1%, pH 8,8 (Bio-Rad). Les bandes sont révélées par trempage du gel dans une solution de bleu de Coomassie (Bio-Rad).

Les fragments Fab forment une bande à 50 kDa. Si la préparation n'est pas pure, des bandes apparaissent à 27 kDa (fragments Fc), à 150 kDa (IgG non clivées) ou 120 kDa (digestion incomplète).

II. METHODES

1. Modèle expérimental

Protocole vaccinal

Les souris BALB/c ou CBA/J femelles sont vaccinées avec 4 injections sous-cutanées de 1 µg de protéine SAG1 dans 50 µl d'eau pour préparation injectable (Aguettant, Lyon) à J1, J5, J9, J13. Les animaux contrôles sont injectés de la même manière avec le véhicule.

1.2. Infection congénitale

La gestation est débutée 4 semaines après la dernière vaccination. Les gestations sont synchronisées pour standardiser ce délai de 4 semaines et pour obtenir des effectifs corrects de souris gestantes dans les différents groupes expérimentaux. Pour cela, des mâles sont placés en cages individuelles pendant 3 jours sans changer la litière. Ils sont ensuite sortis et remplacés par 2 femelles, toujours sans changement de litière, ce qui déclenche l'oestrus 48 heures plus tard. Les mâles sont alors remplacés avec les femelles (1 mâle pour 2 femelles)

pendant 1 nuit. Les animaux sont séparés le lendemain matin qui est noté J1 de gestation. Ce protocole de synchronisation permet d'obtenir 25 à 40% de souris gestantes par groupe.

A J12 de gestation les souris gestantes sont infectées par voie orale avec 10 kystes de ME49.

A J19 de gestation (J7 postinfection) les animaux sont euthanasiés pour évaluer la transmission maternofoetale du parasite et la réponse immunitaire maternelle.

2. Détermination de l'infection congénitale

Le prélèvement des fœtus et des placentas le dernier jour de la gestation, juste avant la mise bas, permet à la fois de récupérer les placentas et d'éviter la transmission du parasite aux nouveau-nés par l'allaitement après la naissance. Les fœtus et les placentas sont identifiés et broyés séparément dans 1 ml de PBS stérile à pH 7,2 puis inoculés par voie intrapéritonéale à des souris SWISS identifiées par marquage aux oreilles. Une séroconversion toxoplasmique est recherchée 5 semaines plus tard par immunofluorescence indirecte. Un prélèvement sanguin est réalisé par voie rétroorbitaire sur les animaux anesthésiés à l'isoflurane. Le sérum dilué au 1/25 est déposé sur des lames portant des tachyzoïtes formolés (bioMérieux, Marcy l'Etoile) pendant 25 minutes à 37°C. La fixation des anticorps spécifiques est révélée par l'addition d'un conjugué polyvalent anti-IgG, IgA et IgM de souris marqué à la fluorescéine (Sigma) dilué au 1/125 dans du PBS pendant 25 minutes à 37°C. La lecture est faite au microscope à fluorescence.

3. Mesure de la parasitémie maternelle

La présence de parasites dans le sang maternel est recherchée par PCR.

- Extraction

L'ADN est extrait avec le système sur colonnes QiAmp DNA Mini Kit™ (Qiagen, Courtaboeuf) selon les recommandations du fabricant. L'extraction est réalisée à partir de 400 µl de sang prélevé sur EDTA par voie rétroorbitaire. Les cellules sont d'abord lysées par addition de 400 µl de tampon Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8 (TE). L'échantillon est ensuite centrifugé 3 min à 6000g, le culot est repris dans 200 µl de tampon TE additionné de 200 µl de tampon de lyse et de 20 µl de protéinase K, et incubé 10 min à 56°C après agitation. Deux cents microlitres d'éthanol absolu sont ajoutés, l'échantillon est agité puis transféré sur une colonne qui fixe l'ADN. Après centrifugation 1 min à 6000 g, le filtrat est éliminé et 500 µl de tampon de lavage AW1 sont ajoutés. Après centrifugation 1 min à 6000 g, le filtrat est éliminé et 500 µl de tampon de lavage AW2 sont ajoutés. Après centrifugation 3 min à 20000 g, le filtrat est éliminé et l'ADN est élué de la colonne avec 200 µl de tampon d'élution (Tris-HCl 10 mM; EDTA 0,5 mM, pH 9) par centrifugation 1 min à 6000 g. L'ADN est conservé à -20°C.

- PCR conventionnelle

Nous utilisons l'amplification du gène B1 qui est répété environ 35 fois dans le génome du parasite (Burg *et al.*, 1989) ce qui permet d'améliorer la sensibilité de la détection car le nombre de parasites circulants est faible dans notre modèle. Les amorces utilisées sont celles décrites par Pelloux *et al.* (Pelloux *et al.*, 1996) : JW58 5'-AAGGGCTGACTCGAACCAGATGT-3' et JW59 5'-GGGCGGACCTCTCTTGTCTCG-3'. Le volume réactionnel est de 50 µl et contient 10 µl d'ADN, 200 µM de dNTP (Invitrogen, Cergy Pontoise), 1,25 U de Hot Start Taq Polymérase (Qiagen), 2 µM de chaque amorce, 5 µl de PCR Buffer 10x (Qiagen) (concentration finale MgCl₂ 1,5 µM), et de l'eau stérile grade PCR QSP 50 µl. En l'absence de signal après amplification, les échantillons sont ré-amplifiés à partir de 1 µl d'ADN pour

éliminer les éventuels inhibiteurs. L'amplification est faite sur GeneAmp PCR system™ 2400 (Perkin Elmer, Courtaboeuf) et comprend une dénaturation initiale avec activation de la polymérase pendant 15 min à 95°C suivie de 45 cycles d'amplification (dénaturation 30 sec à 95°C, hybridation 30 sec à 61°C, élongation 10 sec à 72°C) et d'une élongation terminale pendant 5 min à 72°C. La révélation est faite par électrophorèse en gel d'agarose à 2%. Après 45 min de migration à 130 V, la présence de l'amplicon du gène B1 est visualisée par une bande à 301 pb après coloration au bromure d'éthidium.

Dans ces conditions, le seuil de détection est de 1 parasite pour de l'ADN de *T. gondii* pur et de 5 parasites par ml de sang.

- PCR quantitative en temps réel

La quantification de la parasitémie est faite par PCR quantitative en temps réel sur LightCycler™ (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Allemagne) avec le système LightCycler FastStart DN Master SYBR Green I® (Roche Diagnostics). Le nombre de parasites dans l'échantillon est calculé à partir d'une gamme d'étalonnage s'échelonnant de 1750 à 0,5 parasites par prise d'essai.

La cible est le gène B1 qui amplifié en utilisant les amorces décrites par Costa *et al.* (Costa *et al.*, 2000) : TgB1-S 5'-GGAGGACTGGCAACCTGGTGTCTG-3' et TgB1-A 5'-TTGTTTCACCCGGA-CCGTTTAGCAG-3'. Le volume réactionnel est de 20 µl : ADN 5 µl, réactif Hot Start reconstitué extemporanément (Fast Start Taq DNA polymerase + SYBR Green I) 2 µl, MgCl₂ 25 mM 2,8 µl (concentration finale 3,5 µM), amorces 50 µM 0,2 µl chacune (concentration finale 0,5 µM), eau stérile grade PCR 9,8 µl. En l'absence de signal après amplification, les échantillons sont ré-amplifiés à partir de 1 µl d'ADN pour éliminer les éventuels inhibiteurs. L'amplification comprend une dénaturation initiale avec activation de la polymérase pendant 10 min à 95°C suivie de 45 cycles d'amplification (dénaturation 5 sec à 95°C, hybridation 5

sec à 60°C, élongation 10 sec à 72°C). Des courbes de fusion sont réalisées à la fin de l'amplification pour vérifier la spécificité des amplicons produits (5 sec à 95°C, 15 sec à 69°C) suivies d'un refroidissement jusqu'à 37°C. La spécificité de l'amplicon produit à partir de chaque échantillon est validée par une température de fusion de $85,7 \pm 0,5^\circ\text{C}$ puis la quantité d'ADN présent dans l'échantillon est calculée à partir de la gamme d'étalonnage.

Dans ces conditions, le seuil de détection est de 1 parasite pour de l'ADN de *T. gondii* pur (gamme d'étalonnage) et de 5 parasites par ml de sang.

4. Exploration de la réponse immunitaire maternelle

4.1. Titrage des anticorps spécifiques

Les immunoglobulines totales anti-*T. gondii* sont détectées par immunofluorescence selon la technique décrite précédemment.

Les IgG1 et les IgG2a anti-SAG1 de *T. gondii* sont mesurées par ELISA.

- **Sensibilisation** : des microplaques de 96 puits (Maxisorp®, Nunc) sont sensibilisées une nuit à 4°C avec 100 µl/puits d'une solution de SAG1 à 0,5 µg/ml dans du tampon carbonate bicarbonate 0,1 M pH 9,6.
- **Saturation** : après 2 lavages au PBS-Tween 20 0,05%, les plaques sont saturées une heure à 37°C avec 200 µl par puits de PBS-BSA 1%. Les plaques sont ensuite lavées 2 fois avec du PBS-Tween 20 0,05%.
- **Dépôt des sérums** : des dilutions successives de sérums dilués en PBS-Tween 20 0,05% sont déposées en duplicats (100 µl/puits) et incubées une heure à 37°C. Les plaques sont ensuite lavées 4 fois avec du PBS-Tween 20 0,05%
- **Conjugués** : 100 µl/puits de conjugué anti-IgG1 (anticorps monoclonal de rat, clone X56) ou anti-IgG2a (anticorps monoclonal de rat, clone R19-15) marqué à la peroxydase (BD

Biosciences Pharmingen), dilué au 1/10000 dans du PBS sont ajoutés pendant une heure à 37°C puis les plaques sont lavées 5 fois avec du PBS-Tween 20 0,05%.

- **Révélation** : 100 µl/puits de substrat (TMB, Euromedex, Mundolsheim) sont déposés. La réaction est stoppée après 20 minutes à température ambiante et à l'obscurité avec 100 µl/puits de H₂SO₄ 0,2 M. Les plaques sont lues au spectrophotomètre à 450 nm (Dynatech®, Dynex Thermobio Analysis, Issy les Moulineaux).
- **Résultats** : les titres en IgG1 et IgG2a sont exprimés en dilution limite qui correspond à la dernière dilution dont l'absorbance est supérieure à la (moyenne plus 2 écart-types) de l'absorbance de 3 sérums contrôles négatifs.

4.2. Réponse lymphocytaire splénique

4.2.1. Purification des splénocytes

Toutes les étapes se déroulent à 4°C sur glace selon la technique décrite par Candolfi *et al.* (Candolfi *et al.*, 1994). Chaque rate est traitée individuellement. Les rates sont prélevées stérilement dans 12 ml de milieu complet constitué de milieu RPMI 1640 avec glutamine 2 mM et Hepes 25 mM (Gibco) additionné de 10% de SVFi (Gibco) et d'antibiotiques (Gibco) (pénicilline 50 UI/ml, streptomycine 50 µg/ml, amphotéricine B 1 µg/ml) (RPMI complet). Après broyage entre 2 lames frittées et dissociation des amas cellulaires par pipetage, les débris tissulaires sont éliminés par décantation. La suspension cellulaire est lavée avec 30 ml de RPMI complet puis le culot est traité 5 minutes à température ambiante avec 1 ml de solution de chlorure d'ammonium NH₄Cl 0,83% dans du Tris-HCl 0,01 M pH 7,2 pour lyser les hématies. Le culot traité est déposé délicatement à la surface de 1 ml de SVFi pur et centrifugé à 300 g 10 min à 4°C. Le culot cellulaire est lavé 2 fois avec 10 ml de RPMI

complet. Les cellules sont comptées en cellule de Neubauer avec un colorant vital (bleu de trypan, Gibco).

4.2.2. Numération des sous-populations lymphocytaires T CD4+/CD8+ par cytométrie en flux

Toutes les étapes se déroulent à 4°C. Les cellules sont lavées deux fois avec du PBS additionné de 0,5% de SVFi, ajusté à pH 7,5 et préalablement filtré sur membrane de porosité 0,22 µm. La suspension est ajustée à 1×10^7 cellules/ml. Le volume de travail est de 1×10^6 cellules dans 100 µl de PBS-SVFi 0,5%. Les échantillons sont traités en duplicats. Dans un premier temps, les sites de fixation du Fc des IgG (récepteurs FcγI, FcγII et FcγIII) présents sur les splénocytes sont bloqués par addition de 1 µg d'anticorps monoclonal anti-CD16/32 (IgG2b de rat, clone 2.4G2, DB Biosciences Pharmingen) pour 10^6 cellules pendant 5 min à 4°C. Dans un second temps, les anticorps monoclonaux anti-CD4 (IgG2a de rat marqué à la peroxydase, clone RM4.5, DB Biosciences Pharmingen, 1 µg pour 10^6 cellules) ou anti-CD8 (IgG2a de rat marqué à la peroxydase, clone KT15, Immunotech, Marseille, 1 µg pour 10^6 cellules) sont ajoutés pendant 30 min à 4°C à l'obscurité. Les cellules ensuite sont lavées 2 fois avec du PBS-SVFi 0,5 % et fixées dans 500 µl de paraformaldéhyde à 1,2 %.

Un contrôle de cellules non marquées et un contrôle de cellules traitées avec un isotype contrôle marqué à la peroxydase (IgG2a de rat marqué à la peroxydase, clone LODNP-16, DB Biosciences Pharmingen, 1 µg pour 10^6 cellules) sont inclus dans chaque série. La lecture est faite sur FACS Calibur Flow Cytometer et les données sont analysées à l'aide du logiciel Cell Quest Software (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, Mountain View, USA).

4.2.3. Etude de la prolifération lymphocytaire

Nous utilisons une technique non radiométrique décrite par Huong *et al.* (Huong *et al.*, 1991), le BrdU Labeling and Detection Kit® (Boehringer, Mannheim, Allemagne). Cette technique est basée sur la mesure de l'incorporation de la bromodéoxyuridine (BrdU), un analogue nucléotidique de la thymidine, dans l'ADN des cellules en prolifération. Après fixation des cellules et digestion partielle de l'ADN, la quantité de BrdU incorporé est mesurée par colorimétrie à l'aide d'un anticorps monoclonal marqué à la peroxydase. La prolifération spécifique est mesurée en présence de 1 µg/ml d'AST. Du milieu de culture est utilisé comme témoin négatif et de la concanavaline A (1 µg/ml) est utilisé comme témoin positif.

Cent microlitres de suspension à 4×10^6 splénocytes/ml sont déposés dans des microplaques de culture cellulaire de 96 puits (Nunc). Selon les recommandations du fabricant, la solution de BrdU est ajoutée aux splénocytes après 24 heures de culture (concentration finale 10 µM de BrdU par puits). L'incubation est poursuivie pendant 18 heures puis les plaques sont centrifugées 10 minutes à 300 g, décantées et séchées 2 heures à 60°C. Les cellules sont fixées 30 minutes à -20°C avec une solution d'éthanol 70%/HCl 25%. Les plaques sont lavées 3 fois avec du PBS-SVFi 10% et 100 µl/puits de nucléase sont ajoutés pendant 30 min à 37°C. Après 3 lavages avec du PBS-SVFi 10%, l'anticorps monoclonal anti-BrdU marqué à la peroxydase est ajouté (100µl/puits) et les plaques sont incubées 30 min à 37°C. Après 3 lavages avec le tampon de lavage fourni par le fabricant, 100 µl/puits de substrat (ABTS) sont ajoutés pendant 30 min à température ambiante et à l'obscurité. La réaction est stoppée avec 100 µl/puits de SDS à 1%. L'absorbance est lue à 405 nm et les résultats sont exprimés en DO₄₀₅.

4.2.4. Production de cytokines

Les cytokines sont mesurées dans le sang périphérique et dans le surnageant de culture des splénocytes après stimulation spécifique des cellules avec 1 µg/ml d'AST pendant 48 heures à 37°C sous 5% de CO₂. Du milieu de culture est utilisé comme témoin négatif et de la concanavalline A (1 µg/ml) est utilisé comme témoin positif. L'IFN γ , l'IL2, l'IL10 et l'IL4 sont dosés avec les kits OptEIA® Mouse IFN γ Set, OptEIA® Mouse IL2 Set, OptEIA® Mouse IL10 Set et OptEIA® Mouse IL4 Set (BD Biosciences Pharmingen) dans des microplaques des 96 puits (Nunc). Les seuils de détection sont de 32 pg/ml pour l'IFN γ et l'IL10 et de 8 pg/ml pour l'IL2 et l'IL4.

5. Exploration du rôle des anticorps anti-SAG1

Le rôle des anticorps anti-SAG1 dans la vaccination est étudié *in vivo* par transfert passif d'anticorps polyclonaux et monoclonaux IgG1 et IgG2a à des souris naïves gestantes. Le mécanisme d'action des anticorps est ensuite étudié *in vitro* par des tests de phagocytose, d'invasion cellulaire et de lyse du complément.

5.1. Anticorps

- Anticorps polyclonaux

Les anticorps polyclonaux anti-SAG1 sont produits en vaccinant des souris BALB/c avec de la protéine SAG1 : 4 injections sous-cutanées de 1 µg de protéine SAG1 dans 50 µl d'eau pour préparation injectable à J1, J5, J9, J13 suivies d'une injection de rappel de 1 µg de SAG1 à J45. Les sangs sont prélevés à J60, poolés, centrifugés et décantés. Le sérum est titré en IgG1 et IgG2a anti-SAG1 puis aliquoté par 200 µl à -20°C jusqu'à son utilisation. Le sérum de souris vaccinées titre 1/40000 en IgG1 et 1/100 en IgG2a anti-SAG1 en dilution limite. Le

sérum de souris non vaccinées utilisé pour les anticorps polyclonaux contrôles ne contient pas d'IgG1 et IgG2a anti-SAG1 (titres inférieurs à 1/50).

- Anticorps monoclonaux

Des anticorps monoclonaux IgG1 anti-SAG1 (clone 3F6/G5) et IgG2a anti-SAG1 (clone 8F9-CH2) (Institut de Parasitologie de Strasbourg) sont utilisés pour vérifier la spécificité de l'effet observé et pour comparer l'activité de deux isotypes différents. Les anticorps sont dialysés contre de l'eau pour préparation injectable puis titrés avant leur utilisation. Les anticorps monoclonaux contrôles sont des anticorps de souris purifiés, sans endotoxine ni azide de sodium (Purified mouse IgG1 NA/LE clone 107.3 et Purified mouse IgG2a clone G155-178, DB Biosciences Pharmingen).

5.2. Transfert passif des anticorps *in vivo*

Les anticorps sont transférés à J11 de gestation, soit 24 heures avant l'infection, par injection intrapéritonéale de 200 µl de sérum pour les anticorps polyclonaux ou de 500 µg d'anticorps monoclonaux.

5.3. Etude du mécanisme d'action des anticorps *in vitro*

Des tachyzoïtes de souche RH, préparés comme décrit précédemment, sont utilisés pour toutes les études *in vitro*.

5.3.1. Phagocytose

Des tests de phagocytose par des macrophages sont réalisés avec des toxoplasmes inactivés puis opsonisés.

- **Préparation des macrophages** : les macrophages sont obtenus par lavage péritonéal chez des souris BALB/c injectées 6 jours auparavant avec 1 ml de solution de thioglycollate à 3% (Sigma) par voie intrapéritonéale. Le thioglycollate est un produit irritant qui provoque un afflux de lymphocytes puis de macrophages dans la cavité péritonéale. Les animaux sont euthanasiés à l'isoflurane. L'abdomen est désinfecté, le péritoine est exposé et la cavité péritonéale est lavée 2 fois avec 5 ml de RPMI complet à 4°C. Les macrophages récupérés sont lavés 2 fois avec du RPMI complet à 4°C, comptés en cellule de Neubauer avec du bleu de trypan et mis en culture (4×10^5 macrophages dans 400 μ l de RPMI complet par puits) en plaques de 24 puits (Nunc) pendant 1 nuit à 37°C sous 5% CO₂ et en atmosphère saturée en humidité. Le lendemain, les cellules non adhérentes sont éliminées par lavage au moment du test de phagocytose.

- **Inactivation des tachyzoïtes** : les tachyzoïtes sont inactivés juste avant leur utilisation, par contact avec du formol à 2% pendant 30 min à température ambiante puis lavés 4 fois avec du RPMI 1640 sans SVFi.

- **Opsonisation des tachyzoïtes** : une suspension à 8×10^6 tachyzoïtes/ml est mise en contact avec différentes dilutions de sérum (1/50 à 1/1000) ou d'anticorps monoclonaux (20 à 0,001 μ g/ml) (v/v) pendant 30 min à 37°C. Un contrôle sans anticorps est réalisé parallèlement. Toutes les dilutions sont faites dans du RPMI 1640 sans SVFi pour éviter d'éventuelles interférences liées à la présence d'anticorps dans le SVFi.

- **Test de phagocytose** : les macrophages adhérents sont lavés 2 fois avec 1 ml/puits de RPMI 1640 sans SVFi chauffé à 37°C pour ne pas décrocher les cellules. Deux cents microlitres de suspension de tachyzoïtes opsonisés (soit 4 tachyzoïtes pour 1 macrophage) sont déposés dans chaque puits, les plaques sont centrifugées 1 min à 300 g pour sédimenter les parasites au contact des cellules puis incubées 50 min à 37°C sous 5% de CO₂. Les macrophages sont

ensuite lavés 3 fois avec 1 ml/puits de RPMI 1640 sans SVFi chauffé à 37°C, puis décrochés avec 200µl/puits de trypsine-EDTA (Gibco) pendant 5 min à 37°C. Les cellules sont transférées dans des tubes en verre à 4°C et les puits sont lavés 2 fois avec du RPMI 1640 à refroidi à 4°C et additionné de 20% de SVFi pour neutraliser la trypsine. Les produits de lavage sont ajoutés dans les tubes. Les tubes sont centrifugés 10 min à 300 g et à 4°C. Cent microlitres du culot sont traités par cytocentrifugation puis colorés au May Grunwald Giemsa (MGG). Le nombre de parasites pour 100 macrophages est calculé après comptage au microscope de 200 macrophages par réplicat.

5.3.2. Test de lyse par le complément

La lyse des parasites par le complément en présence d'anticorps anti-SAG1 et contrôles est réalisée par le Docteur Thulliez (Institut de Puériculture, Paris) par la méthode du Dye Test.

5.3.3. Test d'invasion cellulaire

Des tests d'invasion sont réalisés sur des cellules trophoblastiques humaines BeWo (ATCC CCL-98) après opsonisation des tachyzoïtes par les anticorps.

- **Préparation des cellules** : les cellules BeWo sont entretenues en culture par repiquage bihebdomadaire dans du milieu de Dulbecco sans pyruvate de sodium, contenant 4,5 g/l de glucose (Gibco) et supplémenté avec 1% de glutamine (Gibco), 20% de SVFi (Gibco) et des antibiotiques (Gibco) (pénicilline 50 UI/ml, streptomycine 50 µg/ml, amphotéricine B 1 µg/ml). Pour les tests d'invasion cellulaire, 4×10^4 cellules/puits sont déposées dans des plaques de 24 puits (Nunc) et cultivées 3 à 4 jours à 37°C sous 5% CO₂ et en atmosphère saturée en humidité, jusqu'à confluence.

- **Opsonisation des tachyzoïtes** : les tachyzoïtes sont purifiés à partir de l'ascite des souris le jour du test d'invasion. Après 3 lavages en milieu de Dulbecco sans SVFi, une suspension de $7,5 \times 10^6$ tachyzoïtes vivants est mise en contact avec différentes dilutions de sérum (1/50 à 1/1000), d'anticorps monoclonaux entiers ou des fragments Fab correspondants (20 à 0,001 µg/ml) (v/v) pendant 30 min à 37°C. Un contrôle sans anticorps est réalisé parallèlement. Toutes les dilutions sont faites dans du milieu sans SVFi.

- **Test d'invasion cellulaire** : le surnageant de culture des cellules BeWo est éliminé. Deux cents microlitres de suspension de tachyzoïtes opsonisés (soit environ 4 tachyzoïtes pour 1 cellule BeWo) sont déposés dans chaque puits, les plaques sont centrifugées 1 min à 300 g pour sédimenter les parasites au contact des cellules puis incubées 1 heure à 37°C sous 5% de CO₂. Six cents microlitres de milieu sont ajoutés pour 3 heures d'incubation supplémentaires. Les cellules sont ensuite lavées 3 fois avec 1 ml/puits de milieu puis décrochés avec 200 µl/puits de trypsine-EDTA (Gibco) pendant 5 min à 37°C. Les cellules sont transférées dans des tubes en verre à 4°C et les puits sont lavés 2 fois avec du milieu additionné de 20% de SVFi pour neutraliser la trypsine. Les produits de lavage sont ajoutés dans les tubes. Les tubes sont centrifugés 10 min à 300 g et à 4°C. Cent microlitres du culot sont traités par cyto-centrifugation puis colorés au MGG. Le nombre de parasites pour 100 cellules BeWo est calculé après comptage au microscope de 200 cellules par réplicat.

6. Exploration du rôle de l'immunité cellulaire

Le rôle de l'immunité cellulaire dans la vaccination SAG1 est exploré *in vivo* chez la souris par transfert de lymphocytes de souris vaccinées et par déplétion des sous-populations lymphocytaires T CD4⁺ et CD8⁺ après vaccination, et *in vitro* par l'étude de l'activité cytotoxique des lymphocytes de souris vaccinées.

6.1. Etudes *in vivo*

6.1.1. Transfert adoptif de lymphocytes T

Des lymphocytes de souris vaccinées sont transférés à des souris gestantes naïves préalablement immunodéprimées. Durant toute la durée de l'expérimentation les souris sont maintenues en conditions stériles et manipulées sous hotte à flux laminaire.

- ***Immunosuppression des souris receveuses*** : des souris BALB/c sont traitées avec de la fludarabine (Fludara®, Schering, Lys Lez Lannoy) qui déprime quantitativement et fonctionnellement les lymphocytes (Monographie Fludara, 2002). Les animaux sont traités pendant 5 jours par 2 mg/kg/j de fludarabine (100 µl par voie intrapéritonéale). Le traitement est interrompu pendant 2 jours puis repris pendant 5 jours avec 4 mg/kg/j de fludarabine (100 µl par voie intrapéritonéale). La fludarabine étant tératogène, la gestation n'est débutée que 5 jours après la fin du traitement pour permettre l'élimination complète du produit dont la $\frac{1}{2}$ vie terminale est de 20 heures sans effet d'accumulation.

- ***Transfert adoptif*** : des souris BALB/c donneuses sont vaccinées avec la protéine SAG1 ou injectées avec le véhicule. Vingt jours après la dernière immunisation, les animaux sont euthanasiés, les rates sont prélevées stérilement et les splénocytes sont purifiés selon la méthode décrite précédemment. Les souris receveuses sont injectées à J11,5 de gestation soit 16 heures avant l'infection avec 2×10^7 splénocytes dans 0,2 ml de RPMI 1640 par voie intrapéritonéale, ce qui représente environ 6×10^6 lymphocytes T transférés (données obtenues par cytométrie en flux).

6.1.2. Déplétion des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺

Les sous-populations lymphocytaires T CD4⁺ ou CD8⁺ sont déplétées chez les souris vaccinées par injection de 500 µg par voie intrapéritonéale d'anticorps monoclonaux anti-

CD4 (IgG2b de rat, clone GK1.5, BD Biosciences Pharmingen) ou anti-CD8 (IgG2b de rat, clone H35, préparé au laboratoire) 24 heures avant et 3 jours après l'infection.

6.1.3. Neutralisation de l'IFN γ

L'IFN γ est neutralisé par injection intrapéritonéale de 500 μ g d'anticorps monoclonal anti-IFN γ (IgG1 de rat, clone XMG1.2, préparé au laboratoire) 24 heures avant et 3 jours après l'infection.

6.2. Etudes de cytotoxicité *in vitro*

L'activité cytotoxique des lymphocytes T des souris vaccinées sont étudiées *in vitro* vis-à-vis de cellules cibles infectées, par la technique colorimétrique de la β glucuronidase. Le principe du test repose sur le dosage colorimétrique de la β glucuronidase présente dans les granules cytotoxiques et relarguée dans le surnageant de culture après contact entre les cellules effectrices cytotoxiques et des cellules cibles infectées. La dégranulation des cellules cytotoxiques est spécifique car elle est déclenchée par la reconnaissance de l'antigène par le TCR.

- **Préparation des cellules effectrices** : nous utilisons la fraction non adhérente des splénocytes comme cellules effectrices. Cette population cellulaire contient 30 à 40% de lymphocytes T (chiffres mesurés par cytométrie en flux). Pour évaluer les capacités cytotoxiques des lymphocytes T de souris vaccinées mais non infectées, les splénocytes sont prélevés 20 jours après la dernière immunisation puis cultivés *in vitro* en présence de 0,1 μ g/ml d'AST pendant 96 heures. Les splénocytes des souris gestantes infectées sont prélevés en fin d'expérimentation à J7 postinfection, cultivés 18 heures dans du milieu RPMI complet pour séparer les macrophages par adhérence.

- **Déplétion des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺** : une déplétion des lymphocytes T CD4⁺ ou CD8⁺ est réalisée par lyse spécifique des complexes immuns par le complément. Une suspension de 1×10^7 /ml splénocytes non adhérents est incubée avec 10 µg/ml d'anticorps monoclonal anti-CD4 (clone GK1.5, BD Biosciences) ou anti-CD8 (clone H35, préparé au laboratoire) pendant 1 heure à 4°C puis lavée une fois avec du RPMI complet. Le culot cellulaire est incubé pendant 1 heure à 37°C avec du complément de lapin (Low-Tox®-M Rabbit Complement, Cedarlane, Hornby, Canada) dilué au 1/20 dans du RPMI complet et préalablement stérilisé par filtration sur membrane de porosité 0,22 µm. Des contrôles sont réalisés parallèlement avec l'anticorps seul et le complément seul afin de vérifier l'absence de toxicité directe des réactifs. La mortalité cellulaire est vérifiée par coloration au bleu de trypan puis par cytométrie en flux.

- **Neutralisation de l'IFN γ dans le milieu de culture** : L'IFN γ est neutralisé dans le milieu de culture des cellules effectrices par addition de 10 µg/ml d'anticorps monoclonal anti-IFN γ (clone XMG1.2, préparé au laboratoire) dans le milieu de culture 30 minutes avant le test de cytotoxicité.

- **Préparation des cellules cibles infectées** : les cellules cibles sont des macrophages syngéniques infectés. Des macrophages péritonéaux de souris BALB/c sont obtenus comme décrit précédemment. Ils sont cultivés 24 heures à 37°C sous 5% de CO₂ en plaque de 96 puits à fonds ronds (Nunc) à raison de 5×10^5 macrophages par puits dans 200 µl de RPMI complet. On obtient le lendemain environ 2×10^5 macrophages adhérents, presque confluent. Ils sont infectés avec 4×10^5 tachyzoïtes de souche RH (ratio 2:1) pendant 2 heures à 37°C sous 5% de CO₂ puis lavés 3 fois avec 200 µl de RPMI complet. Dans ces conditions, le taux d'infection des macrophages est de 50% avec 80 à 100 parasites pour 100 macrophages.

- **Test de cytotoxicité** : les cellules effectrices sont déposées sur les macrophages infectés selon un ratio cellules effectrices:cellules cibles de 10:1. Ce ratio a été choisi après des tests préliminaires avec des ratio variant de 1:1 à 50:1. Chaque échantillon est déposé en 4 réplicats. Après 4 heures de contact à 37°C sous 5% de CO₂, les plaques sont centrifugées 5 min à 200 g à 4°C et les surnageants sont prélevés. Le dosage de l'activité β glucuronidase est réalisé immédiatement ou sur les surnageants congelés à -20°C. Trois cents microlitres de tampon acétate 0,1 M pH 4,6 contenant 0,04% de triton X-100 et 50 μ l de glucuronate de phénolpthaléine 0,01 M (Sigma) sont ajoutés à 50 μ l de surnageant pendant 1 nuit à 37°C. La réaction est stoppée avec 1 ml de solution de glycine 18,75 g/l ; NaCl 1,46 g/l ; pH 10,4 puis l'absorbance est lue au spectrophotomètre à 550 nm. Dans chaque série sont inclus un contrôle négatif constitué de cellules effectrices seules dans du RPMI complet, un contrôle positif constitué de cellules effectrices seules dans du RPMI complet additionné de 0,1% de Triton X-100 qui provoque la libération dans le milieu du contenu granulaire par effet détergent et permet le dosage de 100% de l'activité β glucuronidase des cellules effectrices, et un contrôle de relargage non spécifique constitué de cellules effectrices et de macrophages non infectés.

Le résultat est exprimé en % de relargage de β glucuronidase par rapport au contrôle positif :

$$\text{Cytotoxicité échantillon (\%)} = \frac{(\text{DO}_{550} \text{ échantillon} - \text{DO}_{550} \text{ contrôle négatif})}{(\text{DO}_{550} \text{ contrôle positif} - \text{DO}_{550} \text{ contrôle négatif})}$$

7. Activité toxoplasmicide des macrophages

L'activité toxoplasmicide des macrophages est étudiée *in vitro* en mesurant la multiplication parasitaire dans les macrophages après 18 heures d'incubation.

- Purification des macrophages

Des macrophages péritonéaux résidents sont obtenus par lavage péritonéal sans injection préalable de thioglycollate. Ils sont purifiés comme précédemment décrit et cultivés pendant 1 nuit à 37°C sous 5% CO₂ et en atmosphère saturée en humidité.

- Infection des macrophages

Les macrophages adhérents sont lavés 2 fois avec 1 ml/puits de RPMI 1640 chauffé à 37°C pour ne pas décrocher les cellules. Deux cents microlitres de suspension de tachyzoïtes (ratio tachyzoïtes:macrophages 2:1) sont déposés dans chaque puits, les plaques sont centrifugées 1 min à 300 g pour sédimenter les parasites au contact des cellules puis incubées 2 heures à 37°C sous 5% de CO₂. Les macrophages sont ensuite lavés 3 fois avec 1 ml/puits de RPMI 1640 sans SVFi chauffé à 37°C et l'incubation est poursuivie pendant 16 heures supplémentaires à 37°C.

- Numération des parasites intracellulaires

Les parasites intra-macrophagiques sont dénombrés après l'incubation initiale de 2 heures et après l'incubation finale de 18 heures. Deux techniques sont utilisées.

Numération microscopique après coloration au MGG : les macrophages sont décrochés avec 200µl/puits de trypsine-EDTA (Gibco) pendant 5 min à 37°C et transférés dans des tubes en verre à 4°C. Les puits sont lavés 2 fois avec du RPMI 1640 à 4°C et additionné de 20% de SVFi pour neutraliser la trypsine. Les produits de lavage sont ajoutés dans les tubes. Après centrifugation 10 min à 300 g et à 4°C, 100 µl du culot sont traités par cytocentrifugation puis colorés au MGG. Le pourcentage de macrophages infectés est calculé après comptage au microscope de 400 macrophages par réplikat. Trois réplicats au moins sont réalisés pour chaque échantillon.

Numération des parasites par PCR quantitative : l'ADN est extrait directement dans les puits de culture après addition 200 µl de tampon TE selon la technique décrite précédemment.

Nous avons utilisé l'amplification du gène SAG2, unique dans le génome du parasite avec les amorces décrites par Gazzinelli *et al.* (Gazzinelli *et al.*, 1993) : SAG2-S 5'-ATGAGTTTCTCAA-AGACCACGAGCCTAGC-3' ET SAG2-A 5'-TTACACAAACGTGATCAACAAACCTGCGAGACC-3'. Le volume réactionnel est de 20 µl : ADN 5 µl, réactif Hot Start reconstitué extemporanément (Fast Start Taq DNA polymerase + SYBR Green I) 2 µl, MgCl₂ 25 mM 2,8 µl (concentration finale 3,5 µM), amorces 50 µM 0,2 µl chacune (concentration finale 0,5 µM), eau stérile grade PCR 9,8 µl. En l'absence de signal après amplification, les échantillons sont ré-amplifiés à partir de 1 µl d'ADN pour éliminer les éventuels inhibiteurs. L'amplification comprend une dénaturation initiale avec activation de la polymérase pendant 10 min à 95°C suivie de 45 cycles d'amplification (dénaturation 5 sec à 95°C, hybridation 5 sec à 61°C, élongation 23 sec à 72°C). Des courbes de fusion sont générées à la fin de l'amplification pour vérifier la spécificité des amplicons produits (5 sec à 95°C, 15 sec à 69°C) suivies d'un refroidissement jusqu'à 37°C. La spécificité de l'amplicon produit à partir de chaque échantillon est validée par une température de fusion de $89 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$.

Le nombre de parasites présents dans l'échantillon est calculé à partir d'une gamme d'étalonnage s'échelonnant de 175000 à 1 parasite par prise d'essai. Dans ces conditions, le seuil de détection est de 2 parasites pour de l'ADN de *T. gondii* pur (gamme d'étalonnage) et de 50 parasites en présence d'ADN non toxoplasmique.

8. Analyse statistique

L'analyse statistique est faite avec le logiciel Prism® (Graphpad Software, San Diego, USA).

Un test de Fisher est utilisé pour les comparaisons de transmission maternofoetale du parasite.

Un test *t* de Student est utilisé pour l'analyse de la réponse immunitaire. Les valeurs de *p* inférieures à 0,05 sont considérées comme statistiquement significatives.

9. Résumé du plan expérimental

Objectif	Souris	Protocole expérimental	Paramètres explorés
Immunogénicité de la protéine SAG1	BALB/c CBA/J	Vaccination Evaluation 7 jours après la dernière immunisation	Réponse immunitaire maternelle : - Cytokines sériques et spléniques - Anticorps anti-SAG1
Protection et réponse immunitaire maternelle après vaccination avec SAG1	BALB/c CBA/J	Vaccination Gestation 4 semaines après la dernière immunisation Infection au 11 ^{ème} jour de gestation Evaluation à J7 postinfection	Transmission maternofoetale du parasite Parasitémie maternelle Réponse immunitaire maternelle : - Cytokines sériques et spléniques - Anticorps anti-SAG1
Rôle de la réponse immunitaire humorale dans la protection vaccinale	BALB/c	<u>Etude <i>in vivo</i></u> chez la souris gestante infectée - Transfert passif d'anticorps polyclonaux anti-SAG1 - Transfert passif d'anticorps monoclonaux anti-SAG1 <u>Etude <i>in vitro</i></u> de 3 mécanismes d'action des anticorps anti-SAG1 sur le parasite - Phagocytose - Lyse par le complément - Neutralisation de l'invasion cellulaire	Transmission maternofoetale du parasite Parasitémie maternelle
Rôle de la réponse immunitaire cellulaire dans la protection vaccinale	BALB/c	<u>Etude <i>in vivo</i></u> chez la souris gestante infectée - Transfert adoptif de splénocytes de souris vaccinées à des souris naïves - Déplétion des LT CD4+ et CD8+ après vaccination - Neutralisation de l'IFN γ après vaccination <u>Etude <i>in vitro</i></u> de l'activité cytotoxique des splénocytes de souris vaccinées et vaccinées/infectées - Splénocytes totaux - Splénocytes déplétés en LT CD4+ ou CD8+ - splénocytes totaux après neutralisation de l'IFN γ	Transmission maternofoetale du parasite Parasitémie maternelle Cytokines sériques et spléniques
Activité toxoplasmicide des macrophages de souris vaccinées	BALB/c	Vaccination Purification des macrophages 7 jours après la dernière immunisation	Capacité des macrophages à contrôler la réplication des parasites intracellulaires

RESULTATS

I. IMMUNOGENICITE DE LA PROTEINE SAG1 CHEZ LA SOURIS NON GESTANTE

Le profil de la réponse immunitaire induite par la vaccination avec la protéine SAG1 est étudié dans deux souches de souris congéniques ayant des fonds génétiques différents, la souris BALB/c (H2^d) et la souris CBA/J (H2^k).

Les animaux sont vaccinés avec 1 µg de SAG1 injecté par voie sous-cutanée deux fois par semaine pendant deux semaines. Le profil de la réponse immunitaire est caractérisé 7 jours après la dernière immunisation en mesurant la production des cytokines Th1 (IFN γ , IL2) et Th2 (IL4, IL10), et la production des isotypes IgG2a et IgG1 anti-SAG1. L'expérience est répétée 3 fois pour chaque souche de souris. Le profil de la réponse immunitaire s'avère différent dans ces deux souches de souris. Les résultats présentés sont issus d'une expérience représentative pour chaque souche de souris.

- **Chez la souris BALB/c la vaccination avec SAG1 induit une réponse immunitaire mixte Th1 et Th2.**

Chez la souris BALB/c, la réponse immunitaire à la vaccination associe une composante Th1, avec une production accrue d'IFN γ par les splénocytes stimulés *in vitro* avec de l'antigène soluble toxoplasmique (AST) (1623 ± 132 pg/ml) par rapport au groupe contrôle (non détectable), et une composante Th2 avec une production d'IgG1 anti-SAG1 (titre 1/100) sans IgG2a. Aucune production spécifique d'IL2, d'IL4 et d'IL10 n'est détectable. Aucune prolifération lymphocytaire n'est mesurable après 48 heures de stimulation spécifique des cellules spléniques par de l'AST.

- **Chez la souris CBA/J la vaccination avec SAG1 induit une réponse immunitaire Th2 prépondérante.**

La production spécifique d'IL2 et d'IFN γ par les splénocytes est significativement plus faible dans le groupe vacciné que dans le groupe contrôle (IL2 : 12 ± 2 et 27 ± 2 pg/ml, $p=0,0011$. IFN γ : 200 ± 30 et 1600 ± 50 pg/ml, $p<0,0001$). La production d'IL4 est faible dans les deux groupes. Aucune production spécifique d'IL10 n'est mesurable. La réponse humorale est de type IgG1 (titre 1/100) sans IgG2a. La prolifération lymphocytaire spécifique des splénocytes est significativement réduite dans le groupe vacciné ($0,163 \pm 0,016$) par rapport au groupe contrôle ($0,294 \pm 0,030$, $p=0,0031$).

II. PROTECTION VACCINALE CHEZ LA SOURIS GESTANTE ET PROFIL DE LA REPONSE IMMUNITAIRE MATERNELLE

Dans un deuxième temps, l'efficacité vaccinale de la SAG1 est évaluée, chez les souris BALB/c et CBA/J, en terme de transmission maternofoetale du parasite au cours d'une primoinfection toxoplasmique pendant la gestation.

Les animaux sont infectés par voie orale à J12 de gestation et euthanasiés 7 jours plus tard, le dernier jour de la gestation. Nous évaluons le nombre de fœtus et de placentas infectés, la parasitémie et le profil de la réponse immunitaire maternelle. L'expérience est reproduite 3 fois pour chaque souche de souris.

1. Transmission maternofoetale du parasite

- **La vaccination ne modifie pas la fertilité des animaux.**

La vaccination ne modifie ni le nombre de gestations (20 à 40% de souris gestantes par protocole expérimental) ni le nombre de fœtus par portée. Chez la souris BALB/c, le nombre moyen de fœtus par portée est de $8,2 \pm 1,0$ dans le groupe contrôle et de $7,8 \pm 0,7$ dans le groupe vacciné. Chez la souris CBA/J, il est de $8,3 \pm 0,7$ dans le groupe contrôle et de $7,0 \pm 2,0$ dans le groupe vacciné. Aucun avortement n'est observé.

- **La vaccination avec SAG1 réduit significativement la transmission maternofoetale du parasite chez la souris BALB/c et, au contraire, l'augmente chez la souris CBA/J.**

Les résultats sont détaillés dans les tableaux 1A et 1B.

La transmission verticale du parasite est significativement réduite par la vaccination chez la souris BALB/c (tableau 1A) et au contraire, augmentée chez la souris CBA/J (tableau 1B).

Les résultats sont statistiquement significatifs dans chaque expérience chez la souris BALB/c, avec une baisse reproductible de 50% du nombre de fœtus infectés dans le groupe vacciné.

Chez la souris CBA/J, la transmission est au contraire toujours plus élevée de 25 à 50% dans le groupe vacciné, mais les différences ne sont pas significatives, probablement en raison d'un effectif insuffisant dans chaque expérience (2 à 4 souris gestantes par groupe).

En prenant en compte l'effectif total des trois expériences, la vaccination avec SAG1 augmente significativement la transmission parasitaire chez la souris CBA/J (contrôle 32%, SAG1 53%; $p=0,0364$). La transmission globale reste significativement réduite chez la souris BALB/c vaccinée par rapport au groupe contrôle (contrôle 72%, SAG1 33%; $p<0,0001$).

Chez les souris BALB/c comme chez les souris CBA/J, tous les placentas sont positifs en subinoculation dans tous les groupes et dans toutes les expériences. Cette positivité ne peut pas être interprétée car elle pourrait simplement refléter la présence des parasites dans le sang maternel.

2. Parasitémie maternelle

- **Chez la souris BALB/c vaccinée, la baisse de la transmission parasitaire est associée à une baisse du nombre de parasites circulants dans le sang maternel à J7 postinfection.**

La quantification des parasites est réalisée par PCR quantitative en temps réel. Les résultats sont détaillés dans le tableau 2. Le nombre de parasites circulants est réduit, selon l'expérience, de 75% à 88% dans les groupes vaccinés par rapport aux groupes contrôles.

- **Chez les souris CBA/J, la présence de parasites circulants est confirmée chez tous les animaux.**

La recherche est faite par PCR conventionnelle, sans quantification, car l'appareillage de PCR en temps réel n'est pas en place au laboratoire à cette période.

Tableau 1. Transmission maternofoetale du parasite à J7 postinfection.

Tableau 1A. Souris BALB/c

	Groupe contrôle			Groupe SAG1			<i>p</i>
	Nb souris gestantes	Fœtus infectés		Nb souris gestantes	Fœtus infectés		
		Nombre	%		Nombre	%	
Exp. 1	4	21 / 33	64%	6	14 / 47	30%	<i>0,0033</i>
Exp. 2	6	34 / 42	81%	5	14 / 34	41%	<i>0,0007</i>
Exp. 3	5	11 / 17	65%	4	6 / 22	27%	<i>0,0264</i>
Total	15	66 / 92	72%	15	34 / 103	33%	<0,0001

Tableau 1B. Souris CBA/J

	Groupe contrôle			Groupe SAG1			<i>p</i>
	Nb souris gestantes	Fœtus infectés		Nb souris gestantes	Fœtus infectés		
		Nombre	%		Nombre	%	
Exp. 1	3	8 / 25	32%	4	14 / 28	50%	0,2651
Exp. 2	2	6 / 15	40%	2	6 / 10	60%	0,4283
Exp. 3	2	4 / 16	25%	3	10 / 19	53%	0,1662
Total	7	18 / 56	32%	9	30 / 57	53%	0,0364

L'analyse statistique est réalisée avec le test de Fisher.

Tableau 2. Parasitémie maternelle chez la souris BALB/c à J7 postinfection.

	Contrôle		SAG1		<i>p</i>
	Nb souris gestantes	Parasitémie (parasites/ml)	Nb souris gestantes	Parasitémie (parasites/ml)	
Exp. 1	4	Non réalisé	6	Non réalisé	
Exp. 2	6	631 ± 112	5	158 ± 82	<i>0,0271</i>
Exp. 3	5	692 ± 161	4	78 ± 31	<i>0,0646</i>
<i>Total</i>	<i>11</i>	<i>658 ± 150</i>	<i>9</i>	<i>120 ± 62</i>	<i>0,0067</i>

La parasitémie est mesurée par amplification du gène B1 en PCR quantitative.

Les résultats sont exprimés en moyenne ± SE des parasitémies individuelles.

L'analyse statistique est réalisée avec le test *t* de Student.

3. Profil de la réponse immunitaire maternelle

- **La baisse de la transmission verticale du parasite chez la souris BALB/c vaccinée est associée à une réponse immune maternelle spécifique mixte Th1 et Th2.**

Les résultats présentés sont issus de l'expérience 1.

Les souris vaccinées avec SAG1 puis infectées produisent des quantités massives d'IgG1 anti-SAG1 (titres de 1/20000 à 1/80000) et de faibles quantités d'IgG2a (titres 1/50 à 1/200) (tableau 3). Le groupe contrôle véhicule ne produit aucune IgG spécifique détectable à J7 postinfection.

Le dosage des cytokines sériques montre une augmentation significative des concentrations d'IFN γ ($p < 0,0001$) et d'IL10 ($p = 0,0074$) dans le groupe vacciné (tableau 4A). Des concentrations faibles d'IL4 sont mesurées dans les deux groupes.

L'étude de la capacité de production *ex vivo* de cytokines par les splénocytes stimulés par de l'AST montre un profil comparable à celui des cytokines sériques (tableau 4B). Seules les cellules des souris vaccinées produisent de l'IFN γ et de l'IL10. L'IL4 n'est pas détectable.

- **L'augmentation de la transmission verticale du parasite chez la souris CBA/J vaccinée est associée à une réponse immune maternelle Th2.**

Les résultats présentés sont issus de l'expérience 1.

Dans le modèle CBA/J, la vaccination par SAG1 induit une production significative d'IgG1 anti-SAG1 (titres de 1/500 à 1/1000) sans production d'IgG2a (tableau 5). Le groupe contrôle véhicule ne produit aucun anticorps détectable à J7 post-infection.

Le dosage des cytokines sériques montre une augmentation des concentrations d'IL10 et d'IL4 ($p < 0,0001$ et $p = 0,0036$) chez les animaux vaccinés, sans modification significative de la concentration d'IFN γ (tableau 6A). La production *ex vivo* des mêmes cytokines dans le

survivant de culture des splénocytes stimulés par de l'AST montre également des concentrations d'IFN γ comparables dans les deux groupes avec une augmentation significative de la concentration d'IL10 ($p=0,0052$) chez les animaux vaccinés (tableau 6B).

L'effet protecteur de la vaccination avec SAG1 observé chez la souris BALB/c gestante nous conduit à explorer les rôles respectifs de l'immunité humorale et cellulaire dans cette souche de souris afin de mieux comprendre les mécanismes de la réponse immunitaire maternelle impliqués dans la protection vaccinale.

Tableau 3. Titres des IgG1 et des IgG2a anti-SAG1 à J7 postinfection chez la souris BALB/c.

	Titres en IgG anti-SAG1	
	IgG1	IgG2a
Contrôle	< 1/25	< 1/25
	< 1/25	< 1/25
	< 1/25	< 1/25
	< 1/25	< 1/25
SAG1	1/20000	1/100
	1/40000	1/100
	1/40000	1/50
	1/80000	1/200
	1/40000	1/100
	1/40000	1/100

Les résultats sont exprimés en dilution limite pour chaque souris.

Tableau 4. Dosage des cytokines chez la souris BALB/c.

Tableau 4A. Concentrations des cytokines dans le sérum à J7 postinfection.

	Concentration des cytokines (pg/ml)		
	IFN γ	IL10	IL4
Contrôle	27 000 $\pm$ 1 250	445 $\pm$ 62	24 $\pm$ 2
SAG1	49 000 $\pm$ 1 600	845 $\pm$ 81	20 $\pm$ 5

Les résultats sont la moyenne $\pm$ SE des concentrations mesurées pour chaque souris (contrôles n=4, SAG1 n=6).

Tableau 4B. Production de cytokines par les splénocytes.

	Concentration des cytokines (pg/ml)		
	IFN γ	IL10	IL4
<u>RPMI</u>			
Contrôle	ND	ND	ND
SAG1	ND	ND	ND
<u>AST</u>			
Contrôle	ND	ND	ND
SAG1	150000 $\pm$ 2691	714 $\pm$ 20	ND

ND : non détectable

Les cytokines sont mesurées dans le surnageant de culture des splénocytes prélevés à J7 postinfection et cultivés 48 heures dans du milieu RPMI additionné ou non d'antigène soluble toxoplasmique (AST). Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ SE des concentrations mesurées pour chaque souris.

Tableau 5. Titres des IgG1 et des IgG2a anti-SAG1 à J7 postinfection chez la souris CBA/J.

	Titres en IgG anti-SAG1	
	IgG1	IgG2a
Contrôles	< 1/25	< 1/25
	< 1/25	< 1/25
	< 1/25	< 1/25
SAG1	1/500	< 1/25
	1/500	< 1/25
	1/500	< 1/25
	1/1000	< 1/25

Les résultats sont exprimés en dilution limite pour chaque souris.

Tableau 6. Dosage des cytokines chez la souris CBA/J.

Tableau 6A. Concentrations des cytokines dans le sérum à J7 postinfection.

	Concentration des cytokines (pg/ml)		
	IFN γ	IL10	IL4
Contrôles	47400 $\pm$ 1650	105 $\pm$ 17	15 $\pm$ 8
SAG1	52000 $\pm$ 1100	896 $\pm$ 30	96 $\pm$ 12

Les résultats sont la moyenne $\pm$ SE des concentrations mesurées pour chaque souris (contrôles n=3, SAG1 n=4).

Tableau 6B. Production de cytokines par les splénocytes.

	Concentration des cytokines (pg/ml)		
	IFN γ	IL10	IL4
<u>RPMI</u>			
Contrôle	7367 $\pm$ 501	146 $\pm$ 23	ND
SAG1	6813 $\pm$ 256	197 $\pm$ 10	ND
<u>AST</u>			
Contrôle	17400 $\pm$ 205	731 $\pm$ 52	22 $\pm$ 20
SAG1	17300 $\pm$ 564	1878 $\pm$ 200	20 $\pm$ 3

ND : non détectable

Les cytokines sont mesurées dans le surnageant de culture des splénocytes prélevés à J7 postinfection et cultivés 48 heures avec ou sans antigène soluble toxoplasmique (AST). Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ SE des concentrations mesurées pour chaque souris.

III. ROLE DE L'IMMUNITE HUMORALE DANS LA PROTECTION VACCINALE CONFERE PAR LA PROTEINE SAG1

Chez la souris BALB/c vaccinée, la baisse de la transmission maternofoetale du parasite est associée à des titres élevés en IgG anti-SAG1. Le rôle de ces anticorps anti-SAG1 dans la protection vaccinale est d'abord exploré *in vivo* par transfert passif d'anticorps anti-SAG1 à des souris gestantes avant l'infection. Différents mécanismes d'action possibles des anticorps - phagocytose, neutralisation, lyse des parasites par le complément - sont ensuite étudiés *in vitro*. Pour ces différentes études, nous utilisons des anticorps anti-SAG1 polyclonaux issus du sérum de souris vaccinées ainsi que des anticorps monoclonaux IgG1 et IgG2a anti-SAG1 afin de comparer les propriétés de ces deux sous-classes d'IgG, la protection vaccinale étant, dans notre modèle, associée à des titres très élevés en IgG1 et faibles en IgG2a anti-SAG1.

1. Transfert passif d'anticorps anti-SAG1

Le rôle des anticorps anti-SAG1 dans la protection vaccinale est évalué par transfert passif d'anticorps polyclonaux et monoclonaux IgG1 et IgG2a anti-SAG1 à des souris BALB/c naïves gestantes.

Le transfert est réalisé par injection intrapéritonéale à J11 de gestation, soit 24 heures avant l'infection, selon les modalités suivantes :

- anticorps polyclonaux : injection de 200 µl de sérum de souris donneuses vaccinées (4x1 µg de SAG1, rappel après 4 semaines, prélèvement 2 semaines après le rappel) ou non vaccinées (groupe contrôle). Le sérum des souris donneuses vaccinées titre 1/40000^e en IgG1 anti-SAG1 et 1/100^e en IgG2a anti-SAG1.

- anticorps monoclonaux : injection de 500 µg d'IgG1 ou d'IgG2a anti-SAG1, de 500 µg d'IgG1 ou d'IgG2a contrôles.

A J7 postinfection (J19 de gestation), les animaux sont euthanasiés. La transmission maternofoetale est évaluée par subinoculation des fœtus et des placentas et la parasitémie maternelle est mesurée par PCR quantitative en temps réel.

Les résultats présentés sont la synthèse de 3 expériences pour les anticorps polyclonaux et de 3 expériences pour les anticorps monoclonaux.

- **Le transfert passif d'anticorps contrôles ou anti-SAG1 réduit significativement la transmission parasitaire.**

Les résultats sont détaillés dans le tableau 7. La transmission maternofoetale du parasite est significativement réduite dans tous les groupes transférés par rapport aux groupes témoins non transférés. Elle est diminuée de 49% avec les anticorps polyclonaux contrôles ($p=0,0026$) et de 59% avec les anticorps polyclonaux anti-SAG1 ($p<0,0001$) par rapport au groupe non transféré pris comme référence. Les anticorps monoclonaux contrôles réduisent la transmission parasitaire de 28% pour les IgG2a ($p=0,0210$) et de 49% pour les IgG1 ($p<0,0001$). Les anticorps monoclonaux anti-SAG1 réduisent la transmission de 35% pour les IgG2a ($p=0,0025$) et de 56% pour les IgG1 ($p<0,0001$).

Il n'y a pas de différence statistique entre les groupes recevant les anticorps contrôles et anti-SAG1. Néanmoins la baisse est toujours plus importante dans les groupes transférés avec les anticorps anti-SAG1. L'effet protecteur des anticorps apparaît donc partiellement non spécifique.

Tous les placentas s'avèrent infectés dans tous les groupes expérimentaux.

- **Les IgG1 anti-SAG1 sont significativement plus efficaces que les IgG2a anti-SAG1.**

Les IgG1 anti-SAG1 réduisent significativement plus la transmission parasitaire (-56%) que les IgG2a anti-SAG1 (-35%) ($p=0,0453$) (tableau 7). La baisse de 56% observée avec les IgG1 anti-SAG1 est concordante avec la baisse de 59% observée avec le sérum de souris vaccinées (anticorps polyclonaux anti-SAG1) qui contient essentiellement des IgG1. Il n'y a pas de différence significative d'efficacité entre les isotypes IgG1 et IgG2a contrôles ($p=0,0956$).

- **La parasitémie maternelle est réduite dans les groupes transférés avec les anticorps contrôles et indétectable dans les groupes transférés avec les anticorps anti-SAG1.**

Le nombre de parasites circulants dans le sang maternel à J7 postinfection est significativement réduit dans tous les groupes transférés avec les anticorps contrôles par rapport aux groupes témoins non transférés (anticorps polyclonaux : $p=0,0129$; anticorps monoclonaux IgG1 : $p=0,0286$; anticorps monoclonaux IgG2a : $p=0,0175$) (tableau 8). Dans tous les groupes transférés avec des anticorps anti-SAG1, la parasitémie est indétectable, inférieure à 5 parasites/ml de sang.

Tableau 7. Transmission maternofoetale du parasite à J7 postinfection après transfert passif d'anticorps polyclonaux ou monoclonaux.

	Témoins sans transfert			Ac contrôles			Ac anti-SAG1		
	Nb gest.	Fœtus infectés		Nb gest.	Fœtus infectés		Nb gest.	Fœtus infectés	
		Nb	%		Nb	%		Nb	%
Ac polyclonaux	7	32 / 51	63%	6	15 / 47	32%	11	18 / 70	26%
Ac monoclonaux									
IgG1	6	31 / 33	94%	8	22 / 46	48%	9	22 / 54	41%
IgG2a	5	23 / 25	92%	7	31 / 47	66%	10	40 / 67	60%

Tableau 8. Parasitémie maternelle à J7 postinfection après transfert passif d'anticorps polyclonaux ou monoclonaux.

	Parasitémie (parasites/ml)		
	Témoins sans transfert	Ac contrôles	Ac anti-SAG1
Ac polyclonaux	381 ± 78	105 ± 42	< 5
Ac monoclonaux			
IgG1	429 ± 148	93 ± 41	< 5
IgG2a	335 ± 103	72 ± 30	< 5

La parasitémie est mesurée par amplification du gène B1 en PCR quantitative.

Les résultats sont exprimés en moyenne ± SE des résultats individuels.

2. Etude des mécanismes d'action des anticorps anti-SAG1

Dans un second temps, nous étudions *in vitro* plusieurs mécanismes d'action possibles des anticorps sur les parasites libres extracellulaires : phagocytose des parasites opsonisés, neutralisation de l'entrée active des parasites dans les cellules, lyse par le complément. Chaque expérience est répétée trois fois.

2.1. Phagocytose

L'opsonisation des microorganismes par les anticorps spécifiques facilite leur phagocytose par les cellules phagocytaires. Nous étudions la phagocytose des tachyzoïtes de souche RH par des macrophages péritonéaux après une incubation préalable des parasites pendant 30 minutes avec les anticorps polyclonaux (sérum) et monoclonaux IgG1 et IgG2a anti-SAG1 et contrôles. Un témoin de phagocytose sans opsonisation est réalisé en parallèle. Les parasites intracellulaires sont ensuite dénombrés au microscope après coloration de MGG.

Les tachyzoïtes sont préalablement inactivés au formol pour bloquer l'entrée active des tachyzoïtes dans les cellules et ne conserver que le mécanisme d'internalisation par phagocytose. Les conditions d'inactivation sont choisies de manière à préserver la structure des antigènes de surface, donc de la SAG1. L'intégrité de la SAG1 est contrôlée par immunofluorescence en vérifiant que la fixation des anticorps polyclonaux et monoclonaux anti-SAG1 sur les parasites n'est pas modifiée par le traitement d'inactivation.

- **Les anticorps spécifiques anti-SAG1 augmentent la phagocytose par les macrophages.**

L'opsonisation des parasites par les anticorps polyclonaux et monoclonaux anti-SAG1 augmente de manière dose dépendante leur phagocytose par les macrophages (figure 1).

L'effet reste statistiquement significatif jusqu'à une dilution du sérum au 1/1000, et jusqu'à une concentration de 0,1 à 0,01 µg/ml pour les anticorps monoclonaux. Les anticorps contrôles n'ont pas d'effet.

- **Les IgG1 anti-SAG1 sont des opsonines plus efficaces que les IgG2a anti-SAG1**

La comparaison de l'efficacité des deux sous-classes d'IgG anti-SAG1 montre qu'à concentration égale, les IgG1 sont toujours statistiquement plus efficaces que les IgG2a jusqu'à 0,01 µg/ml ($p < 0,0001$ pour toutes les concentrations testées) (figure 1).

Les IgG1 sont statistiquement efficaces jusqu'à une concentration de 0,01 µg/ml. Les IgG2a anti-SAG1 ne sont statistiquement efficaces que jusqu'à une concentration de 0,1 µg/ml.

Figure 1. Phagocytose des parasites par les macrophages après opsonisation par les anticorps anti-SAG1.

Figure 1A. Anticorps polyclonaux

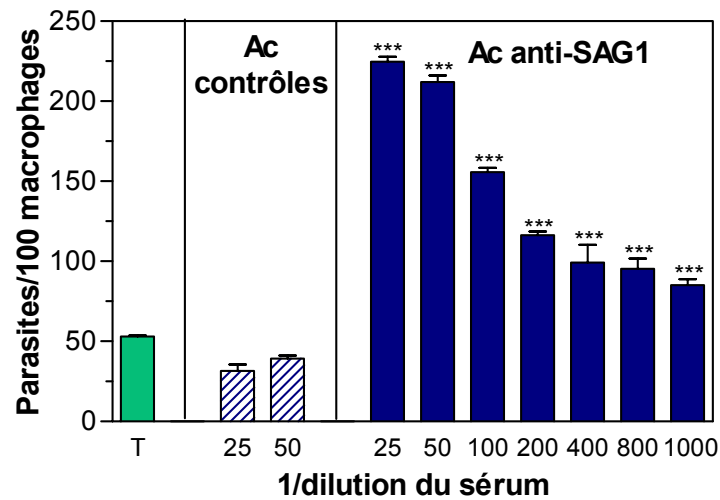
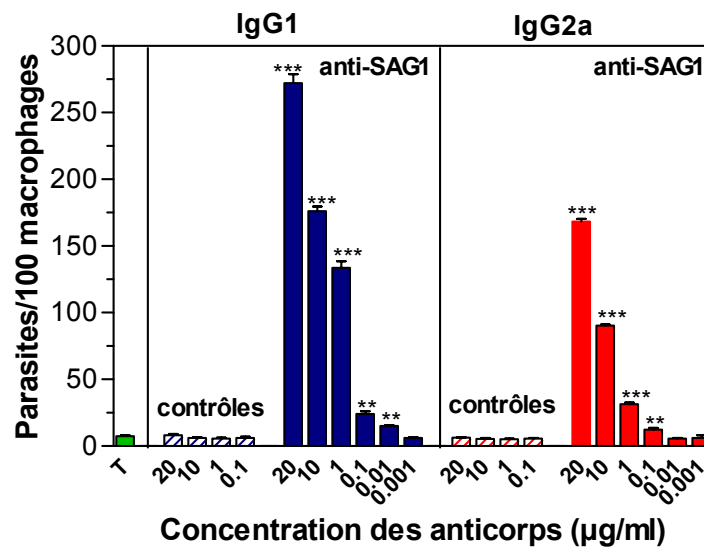


Figure 1B. Anticorps monoclonaux



Chaque dilution d'anticorps est testée sur 6 réplicats. Les parasites intracellulaires sont dénombrés au microscope sur 200 macrophages par réplicat. Les résultats représentent la moyenne $\pm$ SE des 6 réplicats. L'analyse statistique compare les anticorps anti-SAG1 aux anticorps contrôles correspondants par le test *t* de Student : *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$.

T : témoin sans anticorps.

2.2. Lyse par le complément

- **Seules les IgG2a anti-SAG1 activent la voie classique du complément**

La voie classique du complément est activée par la fixation du Fc des anticorps engagés dans les complexes antigène-anticorps sur le C1q et conduit à la formation de complexes d'attaque de la membrane qui lysent le parasite. La lyse parasitaire médiée par les anticorps est mesurée par la méthode du Dye Test (technique réalisée par le Dr. Thulliez) qui permet en outre de titrer l'activité de manière quantitative. Les IgG2a anti-SAG1 présentent une activité lytique élevée titrant 3200. L'activité lytique est indétectable pour les IgG1 monoclonales anti-SAG1 et pour les anticorps polyclonaux anti-SAG1 qui contiennent presque uniquement des IgG1. Les anticorps contrôles n'ont pas d'activité lytique détectable.

2.3. Neutralisation de l'entrée active du parasite dans les cellules

Les tachyzoïtes sont capables de pénétrer dans toutes les cellules nucléées de l'organisme en quelques minutes. Nous étudions l'activité neutralisante des anticorps anti-SAG1 par un test d'invasion cellulaire sur des cellules trophoblastiques BeWo en culture. Les tachyzoïtes sont préalablement incubés 30 minutes avec les anticorps avant d'être déposé sur les cellules. L'entrée active des tachyzoïtes dans les cellules est mesurée après 4 heures d'incubation, par comptage microscopique des parasites intracellulaires.

Dans ces conditions expérimentales, l'incubation préalable des tachyzoïtes avec les anticorps n'affecte pas leur viabilité et n'entraîne pas d'agglutination visible après coloration vitale au bleu de trypan. Un témoin d'invasion par des tachyzoïtes sans anticorps est réalisé en parallèle. Nous avons préalablement vérifié que les cellules BeWo ne sont pas capables de phagocyter les parasites dans les conditions expérimentales choisies.

- **Les anticorps contrôles réduisent significativement l'invasion cellulaire.**

L'incubation préalable des tachyzoïtes avec les anticorps polyclonaux ou monoclonaux contrôles réduit significativement l'entrée active des parasites dans les cellules BeWo par rapport au témoin d'invasion sans anticorps (figures 2A et 2B). Il n'y a pas d'effet dose. Pour les anticorps polyclonaux, l'effet est statistiquement significatif pour toutes les dilutions testées ($p \leq 0,0080$), à l'exception de la dilution 1/1000 pour laquelle l'erreur standard est élevée. Le blocage moyen est de 39%. Pour les anticorps monoclonaux, la diminution de l'entrée active des parasites est statistiquement significative pour deux sous-classes et pour les quatre concentrations testées ($p \leq 0,0081$). Le blocage moyen est de 59% pour les IgG1 et de 46% pour les IgG2a.

- **Les anticorps anti-SAG1 sont significativement plus efficaces que les anticorps contrôles.**

L'incubation préalable des tachyzoïtes avec les anticorps spécifiques anti-SAG1 réduit encore significativement l'invasion cellulaire par rapport aux anticorps contrôles, et cet effet est dose-dépendant (figures 2A et 2B).

Pour les anticorps polyclonaux anti-SAG1, le blocage varie de 86% (dilution 1/50) à 58% (dilution 1/1000). L'activité neutralisante des anticorps spécifiques reste significativement plus élevée que celle des anticorps contrôles jusqu'à la dilution 1/800 ($p \leq 0,0054$).

Pour les anticorps monoclonaux anti-SAG1, le blocage varie de 79% (concentration 20 $\mu\text{g/ml}$) à 29% (concentration 0,1 $\mu\text{g/ml}$) pour les IgG1 et de 75% à 29% pour les IgG2a aux mêmes concentrations. Pour les deux sous-classes d'IgG, l'effet neutralisant des anticorps spécifiques est significativement supérieur à celui des anticorps contrôles jusqu'à 1 $\mu\text{g/ml}$ ($p \leq 0,0054$).

- **L'activité partiellement neutralisante des anticorps non spécifiques passe par la fixation des anticorps sur les tachyzoïtes par leur fragment Fc.**

L'effet partiellement neutralisant des anticorps non spécifiques pourrait s'expliquer par une fixation de ces anticorps sur les tachyzoïtes par leur fragment Fc. Cette hypothèse est vérifiée en utilisant les anticorps monoclonaux.

Dans un premier temps, nous vérifions, par immunofluorescence, la fixation des anticorps non spécifiques sur les tachyzoïtes. Le marquage est régulièrement réparti à la surface des parasites mais il est moins intense que celui obtenu avec les anticorps anti-SAG1 à concentration équivalente.

Dans un deuxième temps, nous vérifions que l'effet neutralisant observé implique la fixation des anticorps par leur fragment Fc en comparant l'activité neutralisante des anticorps entiers et des fragments Fab correspondants après clivage du Fc par la papaïne. Les résultats montrent que l'effet neutralisant des anticorps non spécifiques disparaît complètement lorsque le fragment Fc est clivé (figure 2C). Les fragments Fab des anticorps non spécifiques ne se fixent pas sur les tachyzoïtes et n'ont aucune activité neutralisante. Au contraire, les fragments Fab des anticorps anti-SAG1 conservent la même activité neutralisante que les anticorps entiers correspondants.

Ces résultats confirment que l'effet neutralisant partiel des anticorps non spécifiques résulte de la fixation de ces anticorps sur les tachyzoïtes par leur fragment Fc. Le mécanisme précis par lequel cette fixation limite l'invasion cellulaire n'est pas exploré dans ce travail.

Figure 2. Neutralisation de l'entrée active des parasites par les anticorps anti-SAG1.

Figure 2A. Anticorps polyclonaux

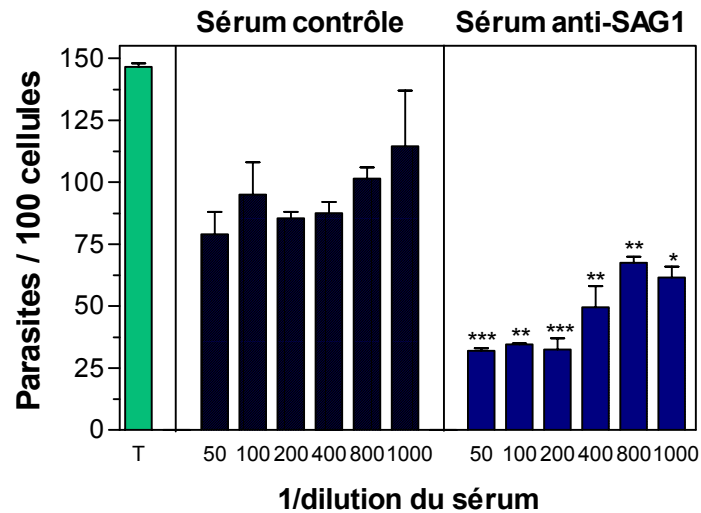
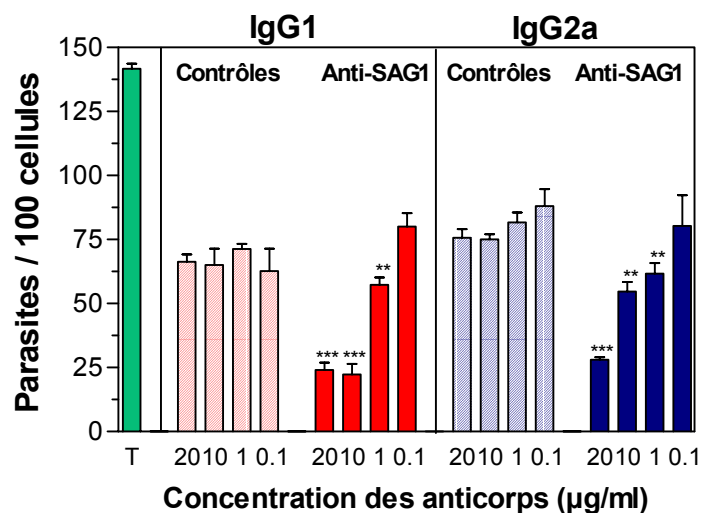


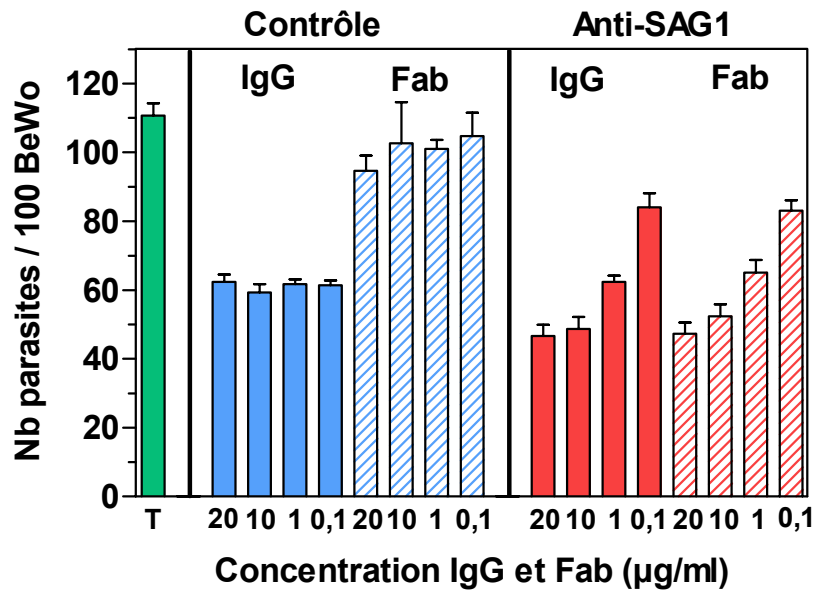
Figure 2B. Anticorps monoclonaux



Chaque dilution d'anticorps est testée sur 6 réplicats. Les parasites intracellulaires sont dénombrés au microscope sur 200 macrophages par réplicat. Les résultats représentent la moyenne $\pm$ SE des 6 réplicats. L'analyse statistique compare les anticorps anti-SAG1 aux anticorps contrôles correspondants par le test *t* de Student : *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,5$.

T : témoin sans anticorps.

Figure 2C. Activité neutralisante des anticorps entiers et des fragments Fab correspondants



Chaque dilution d'anticorps et de fragment Fab correspondant est testée sur 6 réplicats. Les parasites intracellulaires sont dénombrés au microscope sur 200 macrophages par réplicat. Les résultats représentent la moyenne $\pm$ SE des 6 réplicats.

IV. ROLE DE L'IMMUNITE CELLULAIRE DANS PROTECTION VACCINALE CONFERE PAR LA PROTEINE SAG1

Le rôle de l'immunité cellulaire dans la protection conférée par la vaccination avec SAG1 est d'abord exploré *in vivo* par transfert adoptif de lymphocytes T de souris BALB/c vaccinées à des souris BALB/c naïves gestantes et par neutralisation des différents acteurs majeurs de la réponse cellulaire (sous-populations lymphocytaires T CD4⁺/CD8⁺ et IFN γ) chez des souris vaccinées. Dans un second temps l'activité cytotoxique des lymphocytes T est étudiée *in vitro*.

1. Caractérisation des sous-populations lymphocytaires T CD4⁺ et CD8⁺ après vaccination

Les sous-populations lymphocytaires T CD4⁺ et CD8⁺ sont quantifiées par cytométrie en flux dans la rate 20 jours après la dernière immunisation puis 7 jours après l'infection.

- **La vaccination avec SAG1 augmente le nombre de lymphocytes T CD4⁺.**

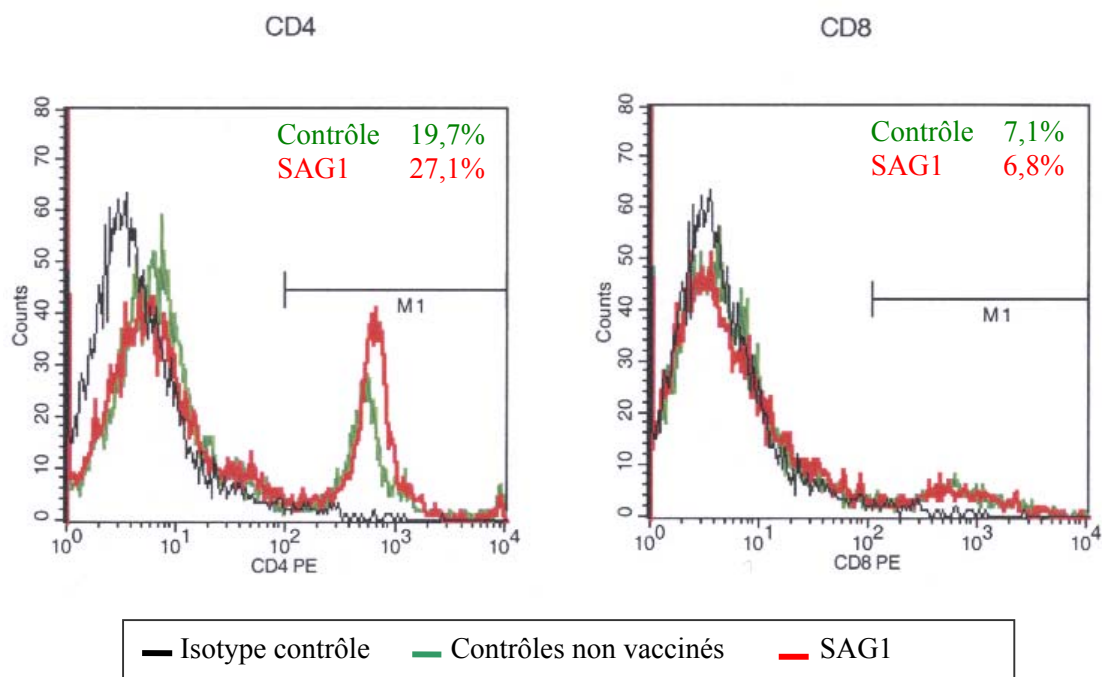
La vaccination augmente le nombre de lymphocytes T CD4⁺ de 35% en moyenne et ne modifie pas le nombre de lymphocytes T CD8⁺ (figure 3A). Les splénocytes des souris non vaccinées contiennent en moyenne 20% de lymphocytes T CD4⁺ et 7% de lymphocytes T CD8⁺. Les splénocytes de souris vaccinées contiennent en moyenne 27% de lymphocytes T CD4⁺ et 7% de lymphocytes T CD8⁺.

- **L'infection augmente le nombre de lymphocytes T CD8+, sans différence entre les groupes vaccinés ou contrôles.**

Sept jours après l'infection, le profil CD4+/CD8+ indique que l'infection augmente le nombre de lymphocytes T CD8+ qui atteint en moyenne 10% dans les deux groupes sans différence entre les animaux vaccinés et contrôles (figure 3B). Le nombre de lymphocytes T CD4+ n'est pas modifié par l'infection.

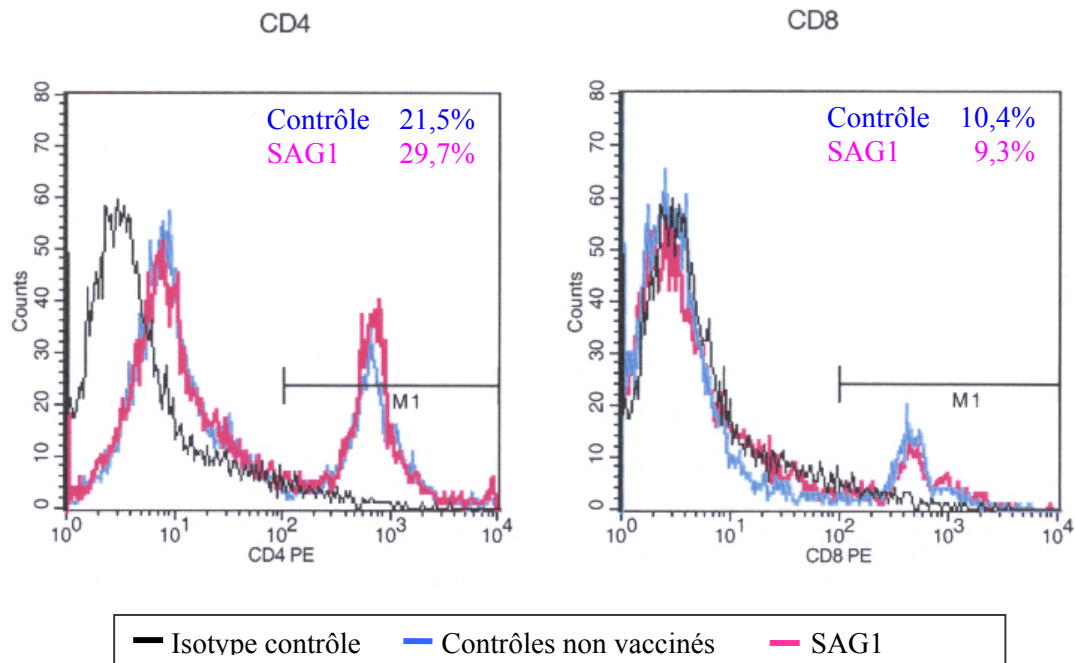
Figure 3. Quantification des lymphocytes T CD4+ et CD8+ dans la rate

Figure 3A. Après vaccination



Les splénocytes sont purifiés 20 jours après la dernière immunisation. Le comptage en cytométrie de flux est réalisé sur 10000 cellules.

Figure 3B. Après vaccination et infection



Les splénocytes sont purifiés 7 jours après l'infection. Le comptage en cytométrie de flux est réalisé sur 10000 cellules.

2. Transfert adoptif de lymphocytes T de souris vaccinées

Dans un premier temps nous évaluons globalement le rôle de l'immunité cellulaire en transférant des lymphocytes T syngéniques de souris vaccinées à des souris naïves gestantes.

Les splénocytes des souris donneuses sont purifiés 20 jours après la dernière immunisation et 2×10^7 cellules (soit environ 6×10^6 lymphocytes T) sont injectées aux souris receveuses gestantes 16 heures avant l'infection. Un groupe contrôle est transféré avec des splénocytes de souris donneuses non vaccinées. Les souris receveuses, ainsi qu'un groupe de souris témoins non transférées, sont préalablement immunodéprimées par des injections de fludarabine pendant les 2 semaines précédant la gestation. L'expérience est répétée 2 fois.

La fludarabine est un immunosuppresseur qui possède un tropisme particulier pour la lignée lymphocytaire (Monographie Fludara, 2002). Elle agit en inhibant la division cellulaire et déclenchant l'apoptose des cellules. La molécule s'accumule dans les lymphocytes et son effet, chez l'homme, persiste plusieurs semaines à plusieurs mois après l'arrêt du traitement.

Des expériences préliminaires nous ont permis de vérifier que le protocole immunosuppresseur choisi ne modifie pas le nombre ou la taille des portées chez la souris BALB/c et que la transmission parasitaire est comparable à celle observée chez les souris non immunodéprimées. Dans ces conditions d'utilisation, la fludarabine réduit de 20% le nombre de lymphocytes T dans la rate et dans le sang périphérique (données acquises en cytométrie de flux, non montrées).

- **Le transfert de lymphocytes T de souris vaccinées réduit la transmission parasitaire et la parasitémie maternelle à J7 postinfection.**

Le transfert de lymphocytes T de souris non vaccinées aux animaux naïfs ne modifie pas la transmission parasitaire par rapport au groupe témoin non transféré ($p=0,6628$) (tableau 9).

Au contraire, le transfert de lymphocytes T de souris vaccinées réduit le nombre de fœtus infectés de 43% par rapport au groupe témoin non transféré ($p=0,0161$), et de 37% par rapport au groupe transféré avec les lymphocytes de souris non vaccinées ($p=0,1568$).

Cette baisse de la transmission est associée à une baisse du nombre de parasites détectables dans le sang maternel 7 jours après l'infection : témoins sans transfert : 117 ± 83 parasites/ml, transfert de lymphocytes de souris non vaccinées : 68 ± 27 , transfert de lymphocytes de souris vaccinées : 25 ± 11 parasites/ml. Les différences ne sont toutefois pas significatives car les écart-types sont élevés.

Tableau 9. Transmission maternofoetale du parasite à J7 postinfection, après transfert de lymphocytes T.

Exp.	Témoins sans transfert			Splénocytes non vaccinés			Splénocytes SAG1		
	Nb gest.	Fœtus infectés		Nb gest.	Fœtus infectés		Nb gest.	Fœtus infectés	
		Nb	%		Nb	%		Nb	%
1	3	18 / 29	62%	2	6 / 11	55%	3	4 / 12	33%
2	5	17 / 31	55%	4	11 / 22	50%	5	10 / 30	33%
Total	8	35 / 60	58%	6	17 / 33	52%	8	14 / 42	33%
					$p=0,6628^a$			$p=0,0161^a$ $p=0,1568^b$	

L'analyse statistique est réalisée avec le test de Fisher :

^a comparaison avec les témoins non transférés

^b comparaison avec le groupe transféré avec les splénocytes contrôles non vaccinés

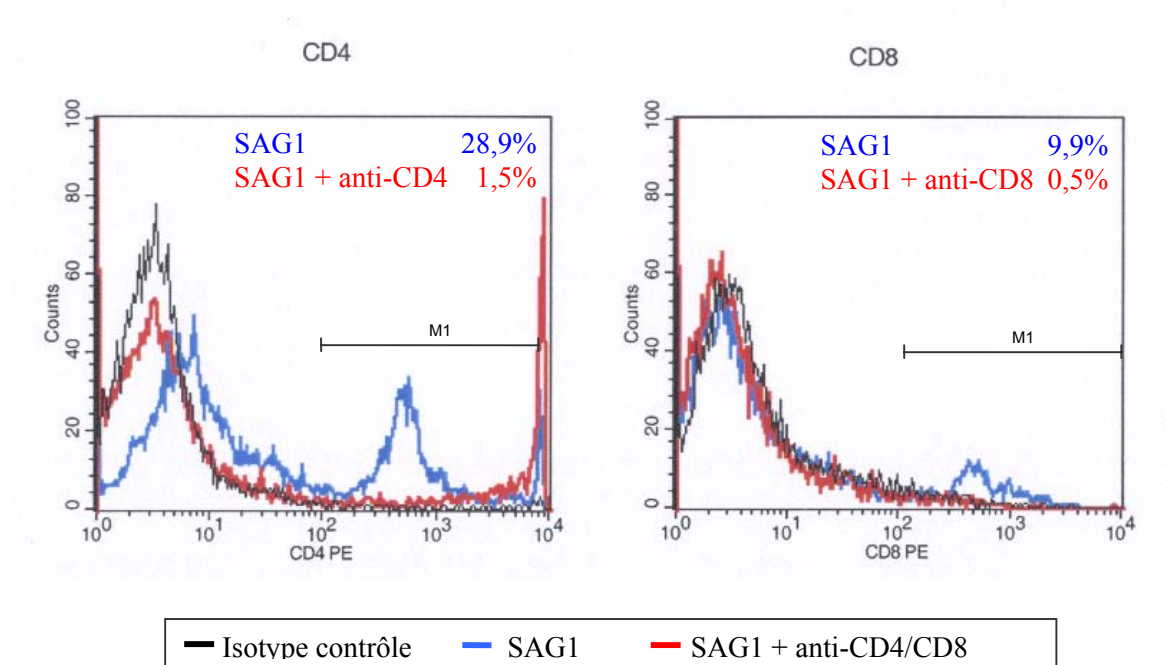
3. Déplétion des sous-populations lymphocytaires T CD4⁺ et CD8⁺ chez la souris vaccinée.

Les expériences précédentes de transfert adoptif indiquent que la protection vaccinale peut être transférée par les splénocytes. Ces transferts ont été réalisés avec des splénocytes totaux qui contiennent des lymphocytes T mais aussi des lymphocytes B sensibilisés capables de produire rapidement des anticorps spécifiques protecteurs et des cellules NK dont le rôle effecteur est démontré en primoinfection (Abou-Bacar *et al.*, 2004). Nous ne pouvons donc pas exclure la participation de ces cellules dans la protection obtenue.

Pour vérifier plus précisément le rôle des lymphocytes T dans la protection vaccinale, les sous-populations lymphocytaires T CD4⁺ et CD8⁺ sont déplétées chez les souris vaccinées en injectant un anticorps monoclonal anti-CD4 ou anti-CD8 24 heures avant et 3 jours après l'infection. La transmission parasitaire et la réponse immunitaire maternelle sont évaluées 7 jours après l'infection. L'expérience est répétée 3 fois.

La déplétion lymphocytaire CD4/CD8 est vérifiée sur les splénocytes par cytométrie en flux à la fin de chaque expérience. Elle est de 85 à 95% pour les lymphocytes T CD4⁺ et de 90 à 94% pour les lymphocytes T CD8⁺ (figure 4).

Figure 4. Quantification des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ dans la rate à J7 postinfection après déplétion des lymphocytes T CD4⁺ ou CD8⁺ chez la souris vaccinée.



Le comptage par cytométrie en flux est réalisé sur 10000 cellules.

- **La protection vaccinale est totalement abolie par la déplétion des lymphocytes T CD8+ et n'est pas modifiée par la déplétion des lymphocytes T CD4+.**

Les résultats des trois expériences sont détaillés dans le tableau 10. L'analyse statistique par expérience est difficile car les effectifs des groupes expérimentaux sont faibles (2 à 5 souris gestantes par groupe). Néanmoins, les résultats obtenus dans les 3 expériences sont reproductibles. Dans chaque expérience, la déplétion des lymphocytes T CD8+ après la vaccination abolit complètement la protection vaccinale alors que la déplétion des lymphocytes T CD4+ ne la modifie pas. En prenant en compte l'effectif total des trois expériences, le pourcentage de fœtus infectés est de 24% dans le groupe vacciné avec SAG1, de 28% dans le groupe vacciné et traité avec l'anti-CD4 ($p=0,6768$) et de 57% dans le groupe vacciné et traité avec l'anti-CD8 ($p=0,0014$). Dans ce dernier groupe, la transmission n'est pas différente de celle du groupe témoin non vacciné (59%, $p=1$).

Ces résultats indiquent que les lymphocytes T CD8+ sont des effecteurs majeurs de la protection vaccinale au cours de l'infection. Les lymphocytes T CD4+ n'ont pas de rôle effecteur direct au moment même de l'infection.

- **La déplétion des lymphocytes T CD8+ s'accompagne d'une augmentation de la parasitémie maternelle.**

Le nombre de parasites circulants dans le sang maternel sept jours après l'infection est 6 fois plus élevé dans le groupe vacciné et traité avec l'anti-CD8 que dans le groupe vacciné (respectivement 698 ± 142 parasites/ml et 112 ± 35 parasites/ml, $p=0,0004$) (tableau 11).

Tableau 10. Transmission maternofoetale du parasite à J7 postinfection après déplétion des lymphocytes T CD4+ ou CD8+ chez la souris vaccinée.

Exp.	Témoins non vaccinés			SAG1			SAG1 + anti-CD4			SAG1 + anti-CD8		
	Nb gest.	Fœtus infectés		Nb gest.	Fœtus infectés		Nb gest.	Fœtus infectés		Nb gest.	Fœtus infectés	
		Nb	%		Nb	%		Nb	%		Nb	%
1	3	8 / 12	67%	4	2 / 11	18%	5	6 / 29	20%	5	14 / 24	58%
2	4	15 / 27	56%	4	7 / 26	27%	5	9 / 26	35%	2	7 / 12	58%
3	3	14 / 24	58%	3	3 / 13	31%	2	4 / 13	32%	2	3 / 6	50%
Total	10	37 / 63	59%	11	12 / 50	24%	12	19 / 68	28%	9	24 / 42	57%
					<i>p=0,0003^a</i>			<i>p=0,6768^b</i>			<i>p=0,0014^b</i>	

L'analyse statistique est réalisée avec le test de Fisher :

^a comparaison avec les témoins non vaccinés

^b comparaison avec le groupe vacciné SAG1

Tableau 11. Parasitémie maternelle à J7 postinfection après déplétion des lymphocytes T CD4+ ou CD8+ chez la souris vaccinée.

Exp.	Parasitémie (parasites/ml)			
	Témoins non vaccinés	SAG1	SAG1 + anti-CD4	SAG1 + anti-CD8
1	531 ± 295	47 ± 13	241 ± 43	670 ± 237
2	504 ± 159	179 ± 81	385 ± 209	575 ± 99
3	854 ± 207	108 ± 54	578 ± 360	755 ± 228
Total	693 ± 175	112 ± 35	389 ± 126	698 ± 142
		<i>p=0,0029^a</i>	<i>p=0,0546^b</i>	<i>p=0,0004^b</i>

La parasitémie est mesurée par amplification du gène B1 en PCR quantitative.

Les résultats sont la moyenne ± SE des parasitémies mesurées par souris.

L'analyse statistique est réalisée avec le test *t* de Student :

^a comparaison avec les témoins non vaccinés

^b comparaison avec le groupe vacciné SAG1

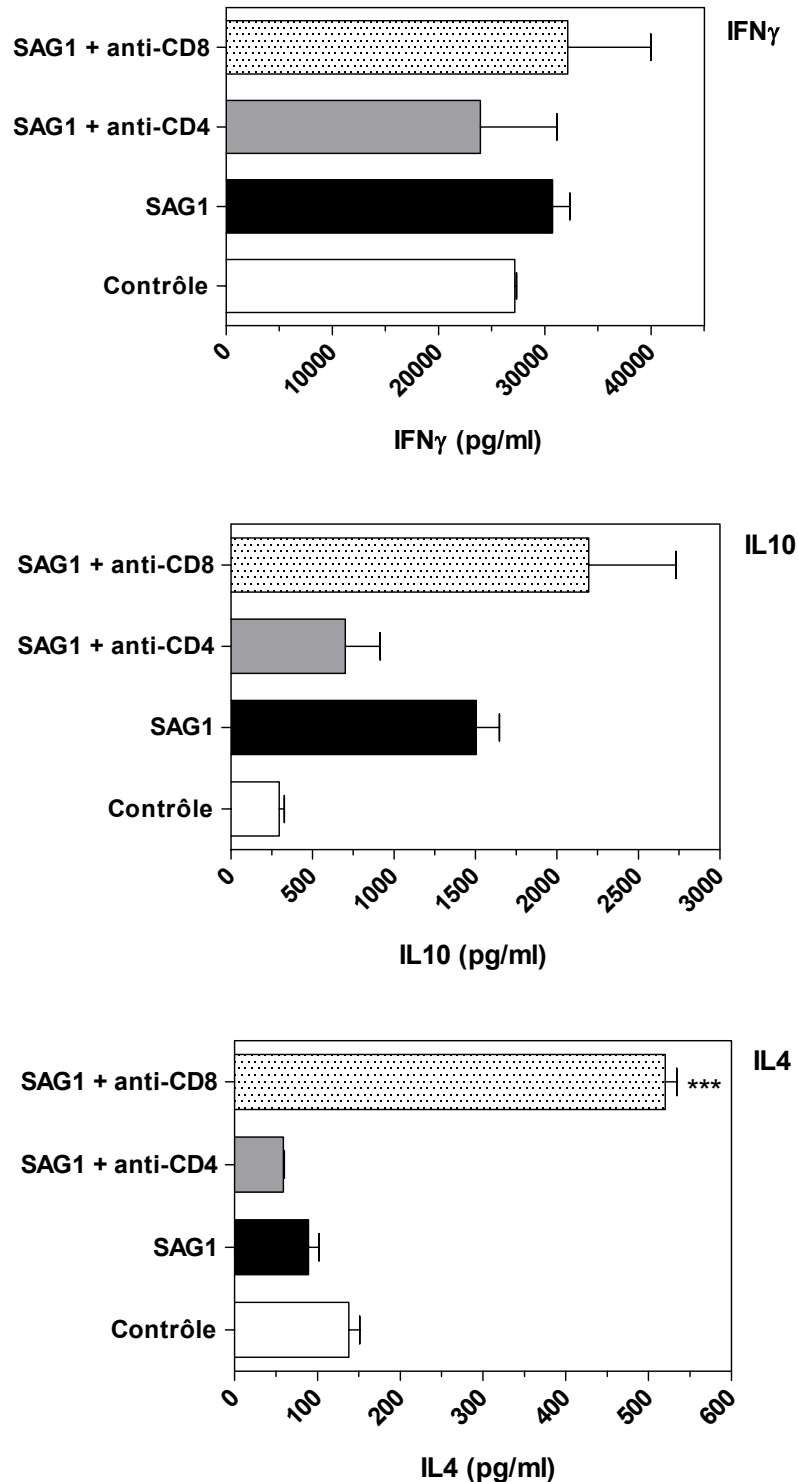
- **La déplétion des lymphocytes T CD8+ s'accompagne d'une augmentation massive de la production d'IL4.**

Le dosage des cytokines est réalisé dans le sérum à J7 postinfection. Le profil comparatif des concentrations de cytokines est reproductible d'une expérience à l'autre.

La déplétion des lymphocytes T CD4+ s'accompagne d'une diminution de 20% environ de la concentration d'IFN γ (non significatif) et de 50% environ de la concentration d'IL10 ($p=0,0458$) (figure 5). La concentration d'IL4 n'est pas modifiée. Au contraire, la déplétion des lymphocytes T CD8+ n'a pas d'effet sur les concentrations d'IFN γ et d'IL10 mais augmente massivement, d'environ 500%, la concentration d'IL4 ($p=0,0002$).

L'étude *ex vivo* de la capacité de production des mêmes cytokines par les splénocytes stimulés pendant 48 heures avec de l'AST confirme les résultats obtenus dans le sérum (tableau 12). La production spécifique d'IFN γ et d'IL10 est réduite de 70% dans le groupe traité avec l'anti-CD4 (respectivement $p=0,0117$ et $p=0,0317$) et inchangée dans le groupe traité avec l'anti-CD8+ par rapport au groupe vacciné. Une production spécifique modérée d'IL4 n'est détectable que dans le groupe traité avec l'anti-CD8.

Figure 5. Concentration des cytokines dans le sérum à J7 postinfection après déplétion des lymphocytes T CD4+ ou CD8+ chez la souris vaccinée.



Les résultats sont la moyenne $\pm$ SE des concentrations mesurées pour chaque souris de l'expérience 1. L'analyse statistique est faite par rapport au groupe SAG1. ***p<0,0001.

Tableau 12. Production des cytokines par les splénocytes après déplétion des lymphocytes T CD4+ ou CD8+ chez la souris vaccinée.

	IFN γ (pg/ml)			IL10 (pg/ml)			IL4 (pg/ml)		
	RPMI	ConA	AST	RPMI	ConA	AST	RPMI	ConA	AST
Témoins NV	8513 $\pm$ 1882	84844 $\pm$ 8629	25009 $\pm$ 1713	186 $\pm$ 63	1523 $\pm$ 36	110 $\pm$ 38	ND	173 $\pm$ 1	ND
SAG1	29410 $\pm$ 4265	84386 $\pm$ 9651	39433 $\pm$ 6634	233 $\pm$ 97	1780 $\pm$ 181	344 $\pm$ 52	ND	224 $\pm$ 2	ND
SAG1 + anti-CD4	9616 $\pm$ 199	32554 $\pm$ 14014	9852 $\pm$ 1051	473 $\pm$ 14	320 $\pm$ 27	107 $\pm$ 52	ND	31 $\pm$ 1	ND
SAG1 + anti-CD8	25345 $\pm$ 3381	100012 $\pm$ 9686	41389 $\pm$ 2301	224 $\pm$ 77	1749 $\pm$ 172	261 $\pm$ 18	17 $\pm$ 0	214 $\pm$ 10	47 $\pm$ 2

Les cytokines sont mesurées dans le surnageant de culture des splénocytes prélevés à J7 postinfection et cultivés 48 heures dans du milieu simple (RPMI), en présence de concanavaline A (ConA) ou en présence d'antigène toxoplasmique (AST).

Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ SE des concentrations mesurées pour chaque souris.

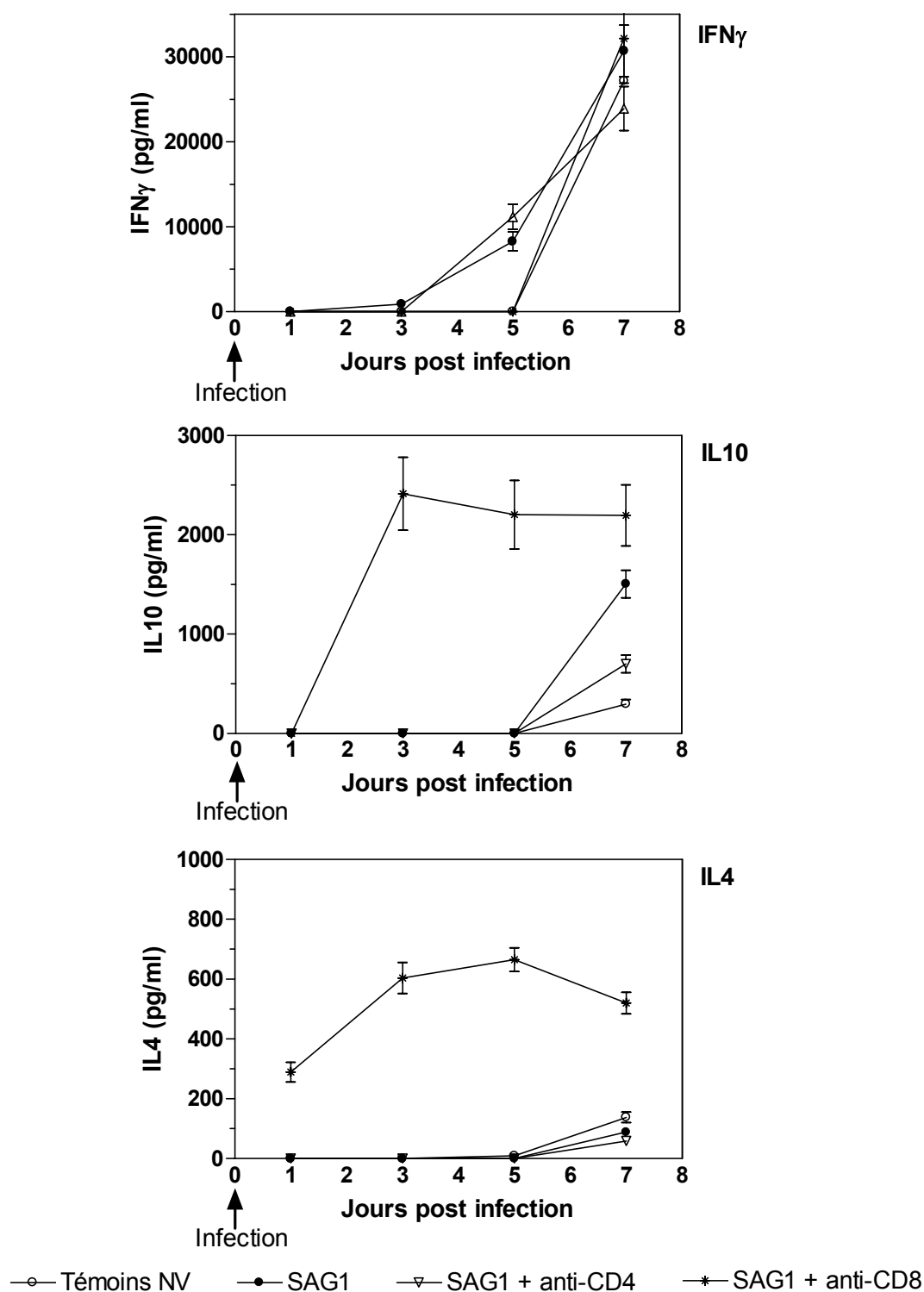
- **La déplétion des lymphocytes T CD8+ s'accompagne d'une production d'IFN γ retardée au cours de l'infection.**

Dans le groupe déplété en lymphocytes T CD8+, l'absence de variation significative de la concentration d'IFN γ à J7 postinfection paraît surprenante car cette cytokine joue un rôle protecteur crucial au cours de la toxoplasmose en dehors de la gestation.

Dans notre modèle, la transmission parasitaire débute dès le quatrième jour après l'infection et augmente régulièrement pour atteindre 60 à 70% d'infection fœtale au septième jour postinfection (Abou-Bacar *et al.*). La cinétique de production des cytokines au cours des 7 jours postinfection s'avère informative dans ce contexte (figure 6). L'IFN γ apparaît précocement dans le sérum, entre le 3^{ème} et le 5^{ème} jour de l'infection, chez les souris vaccinées et chez les souris traitées avec l'anti-CD4. Chez les souris vaccinées puis traitées avec l'anticorps anti-CD8, la production d'IFN γ est retardée et n'apparaît qu'entre le 5^{ème} et le 7^{ème} jour de l'infection alors que des concentrations élevées d'IL10 sont mesurées dès le 3^{ème} jour et que l'IL4 est déjà mesurable 24 heures après l'infection. Pour ces dosages, les sérums ont été poolés dans chaque groupe expérimental afin de limiter le volume sanguin prélevé par animal.

Ces résultats indiquent que l'IL4 pourrait jouer un rôle important et favoriser la transmission maternofoetale du parasite. Le rôle de l'IFN γ apparaît moins clair car, si la perte de la protection vaccinale en l'absence de lymphocytes T CD8+ est associée à une production retardée d'IFN γ au cours de l'infection, les concentrations mesurées à J7 postinfection et la capacité de production par les splénocytes ne sont pas modifiées.

Figure 6. Cinétique de production des cytokines dans le sérum entre J1 et J7 postinfection après déplétion des lymphocytes T CD4⁺ ou CD8⁺ chez la souris vaccinée.



Les concentrations utilisées pour les courbes sont mesurées chez les souris de l'expérience 1 à J1, J3, J5 et J7 postinfection. Les sérums sont poolés dans chaque groupe expérimental.

- **Les lymphocytes T CD4⁺ sont les principales cellules productrices de cytokines dans la rate.**

Les données obtenues à partir des splénocytes suggèrent que les cytokines sont majoritairement produites par les lymphocytes T CD4⁺. En effet, la capacité de production spécifique d'IFN γ et d'IL10 est réduite de 70% dans le groupe traité avec l'anti-CD4 (respectivement $p=0,0117$ et $p=0,0317$) alors qu'elle n'est pas modifiée dans le groupe traité avec l'anti-CD8 (tableau 12).

Des dosages réalisés après stimulation non spécifique des lymphocytes T par la ConA vont dans le même sens. La capacité de production des cytokines est réduite de 60% pour l'IFN γ ($p=0,0382$), de 82% pour l'IL10 ($p=0,0013$) et de 86% pour l'IL4 ($p<0,0001$) dans le groupe traité avec l'anti-CD4.

4. Neutralisation de l'IFN γ chez la souris vaccinée

Le rôle central de l'IFN γ dans la régulation de la réponse immunitaire anti-toxoplasmique est bien établi en dehors de la gestation. Son rôle dans la transmission maternofoetale du parasite est en revanche encore peu connu. Dans notre modèle, la diminution de la transmission parasitaire chez les souris vaccinées est associée à une production accrue d'IFN γ et la neutralisation des lymphocytes T CD8⁺ qui abolit la protection vaccinale s'accompagne d'une production retardée d'IFN γ . Pour explorer précisément le rôle de cette cytokine dans le contrôle de la transmission verticale du parasite, l'IFN γ est neutralisé chez la souris vaccinée en injectant un anticorps monoclonal anti-IFN γ 24 heures avant et 3 jours après l'infection. L'expérience est répétée 3 fois.

- **La neutralisation de l'IFN γ abolit totalement l'effet protecteur de la vaccination.**

Dans chacune des trois expériences, la neutralisation de l'IFN γ abolit totalement l'effet protecteur de la vaccination. Les résultats sont détaillés dans le tableau 13. Malgré des effectifs faibles de 3 à 6 souris par groupe, la différence entre les groupes SAG1 et SAG1 + anti-IFN γ est statistiquement significative chaque expérience (exp. 1 $p=0,0209$, exp. 2 $p=0,0075$, exp. 3 $p=0,0127$).

Ces résultats confirment que l'IFN γ est, tout comme les lymphocytes T CD8+, un effecteur majeur dans la protection conférée par la vaccination avec SAG1.

- **La neutralisation de l'IFN γ est associée à une augmentation du nombre de parasites circulants.**

La vaccination avec SAG1 réduit de 87% le nombre de parasites circulants par rapport aux témoins non vaccinés (78 ± 22 vs 616 ± 116 parasites/ml, $p=0,0002$) (tableau 14). La neutralisation de l'IFN γ chez les animaux vaccinés augmente significativement la parasitémie maternelle (411 ± 81 parasites/ml, $p=0,00013$).

Tableau 13. Transmission maternofoetale du parasite à J7 postinfection après neutralisation de l'IFN γ chez la souris vaccinée.

Exp.	Témoins non vaccinés			SAG1			SAG1 + anti-IFN γ		
	Nb gest.	Fœtus infectés		Nb gest.	Fœtus infectés		Nb gest.	Fœtus infectés	
		Nb	%		Nb	%		Nb	%
1	3	8 / 12	67%	4	2 / 11	18%	5	12 / 18	67%
2	4	15 / 27	56%	4	7 / 26	27%	4	18 / 28	64%
3	6	18 / 32	56%	3	5 / 20	25%	6	25 / 40	63%
Total	13	41 / 71	58%	11	14 / 57	25%	15	55 / 86	64%
					<i>p=0,0002^a</i>			<i>P<0,0001^b</i>	

L'analyse statistique est réalisée avec le test de Fisher :

^a comparaison avec les témoins non vaccinés

^b comparaison avec le groupe vacciné SAG1

Tableau 14. Parasitémie maternelle à J7 postinfection après neutralisation de l'IFN γ chez la souris vaccinée.

Exp.	Parasitémie (parasites/ml)		
	Témoins non vaccinés	SAG1	SAG1 + anti-IFN γ
1	531 $\pm$ 295	47 $\pm$ 13	295 $\pm$ 116
2	504 $\pm$ 159	179 $\pm$ 81	336 $\pm$ 150
3	772 $\pm$ 105 ^a	86 $\pm$ 44	556 $\pm$ 62 ^a
Total	616 $\pm$ 116	78 $\pm$ 22 <i>p=0,0002^b</i>	411 $\pm$ 81 <i>p=0,0013^c</i>

La parasitémie est mesurée par amplification du gène B1 en PCR quantitative.

Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ SE.

^a Parasitémie moyenne calculée sur 4 souris (présence d'inhibiteur pour 2 souris).

L'analyse statistique est réalisée avec le test *t* de Student :

^b comparaison avec les témoins non vaccinés ;

^c comparaison avec le groupe vacciné SAG1.

5. Etude de l'activité cytotoxique des lymphocytes T des souris vaccinées

Les expériences précédentes de transfert adoptif et de neutralisation indiquent que les lymphocytes T, et plus particulièrement la sous-population CD8+, ainsi que l'IFN γ participent directement au contrôle de la transmission maternofoetale du parasite chez la souris vaccinée. Les lymphocytes T CD8+ peuvent agir soit indirectement par le biais de la production de cytokines soit directement en détruisant les cellules infectées.

Notre étude de l'activité cytotoxique des lymphocytes T de souris vaccinées comprend trois objectifs : évaluer la cytotoxicité globale des splénocytes, identifier la sous-population lymphocytaire T CD4+ ou CD8+ responsable de cette activité et explorer le rôle de l'IFN γ dans ce mécanisme. Pour chaque objectif, l'étude est réalisée successivement sur des splénocytes de souris vaccinées non infectées puis sur des splénocytes de souris vaccinées et infectées pour se placer dans les conditions de l'infection congénitale.

L'activité cytotoxique des lymphocytes T est testée vis-à-vis de macrophages péritonéaux syngéniques préalablement infectés avec des tachyzoïtes de souche RH. Les cellules effectrices sont constituées de la fraction non adhérente des splénocytes. L'activité cytotoxique est mesurée après 4 heures de contact entre les cellules effectrices et les macrophages infectés, par dosage de l'activité β glucuronidase granulaire relarguée par les cellules effectrices activées dans le surnageant de coculture.

5.1. Activité cytotoxique globale des lymphocytes T de souris vaccinées

Dans un premier temps, l'activité cytotoxique globale des lymphocytes T est étudiée à partir de splénocytes de souris vaccinées non infectées, prélevés 20 jours après la dernière immunisation et stimulés pendant 96 heures avec de l'AST pour les enrichir en cellules spécifiques. Nous avons ajouté cette étape de restimulation *in vitro* car le différentiel d'activité cytotoxique entre les cellules de souris vaccins et non vaccinées n'était pas mesurable

lorsque la cytotoxicité était mesurée immédiatement après le prélèvement des splénocytes, probablement en raison d'un nombre de clones spécifiques trop faible dans la rate (données issues d'essais préliminaires non montrés). Un contrôle est constitué de splénocytes de souris non vaccinées, cultivés dans les mêmes conditions. Le relarguage basal de β glucuronidase, non induit par le parasite, est mesuré en utilisant des macrophages non infectés. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'activité enzymatique relarguée par rapport à un témoin positif constitué de splénocytes additionnés de Triton X-100. L'expérience est répétée trois fois.

- **Les splénocytes des souris vaccinées sont cytotoxiques vis-à-vis des macrophages infectés.**

Les résultats sont présentés dans le tableau 15A. L'activité cytotoxique des splénocytes vis-à-vis de macrophages non infectés est faible (4 à 7%) et comparable dans les groupes contrôles et vaccinés. La vaccination augmente l'activité cytotoxique des splénocytes de 20% par rapport aux splénocytes contrôles ($p=0,0004$). Une activité cytotoxique significative est toutefois observée avec les splénocytes contrôles. Elle pourrait s'expliquer par une cytotoxicité non spécifique des 3 à 5% de cellules NK présentes dans la population de cellules splénocytaires et par la différenciation possible de lymphocytes T cytotoxiques compétents au cours des 96 heures de stimulation *in vitro* avec de l'AST.

- **L'activité cytotoxique des splénocytes des souris vaccinées s'accompagne d'une production accrue d'IFN γ pendant le temps de contact avec les macrophages infectés.**

La production d'IFN γ au cours des 4 heures de contact entre les cellules effectrices et les macrophages infectés est mesurée dans le surnageant de coculture à l'issue du test. Les splénocytes des souris vaccinées produisent deux fois plus d'IFN γ que les splénocytes

contrôles (24993 ± 6678 pg/ml contre 11204 ± 1165 pg/ml, $p=0,1117$, résultat exprimé en moyenne $\pm$ SE de trois réplicats de coculture).

Dans un second temps, l'activité cytotoxique des splénocytes est étudiée dans le modèle d'infection congénitale, ce qui permet également de s'affranchir de l'étape de stimulation *in vitro* qui pourrait modifier les propriétés des lymphocytes T. Les splénocytes sont prélevés à J7 postinfection et mis en culture dans du RPMI pendant 18 heures pour éliminer les macrophages adhérents avant d'être testés en cytotoxicité. Les résultats confirment ceux obtenus précédemment avec les splénocytes des souris vaccinées mais non infectées.

- **Les splénocytes des souris vaccinées puis infectées sont cytotoxiques vis-à-vis de macrophages infectés.**

Les splénocytes des souris vaccinées présentent une activité cytotoxique spécifique significativement plus élevée que les splénocytes des souris non vaccinées (53% contre 44%, $p=0,00190$) (tableau 15B). L'activité cytotoxique non induite par le parasite est inférieure à 6%.

- **L'activité cytotoxique des splénocytes des souris vaccinées puis infectées est associée à une augmentation de la concentration d'IFN γ dans l'environnement des cellules effectrices avant le contact avec les macrophages infectés.**

L'IFN γ est dosé dans l'environnement des cellules effectrices pendant les 18 heures de culture précédant le test. Les quantités d'IFN γ produites durant ces 18 heures s'avèrent 10 fois plus élevées dans l'environnement des splénocytes de souris vaccinées que dans celui des splénocytes des souris non vaccinées (488 ± 154 pg/ml contre 49 ± 15 pg/ml, $p=0,0470$).

Tableau 15. Activité cytotoxique globale des splénocytes.

Tableau 15A. Après vaccination

	Activité β glucuronidase (%)	
	Splénocytes NV	Splénocytes SAG1
Macrophages non infectés	5 $\pm$ 1	4 $\pm$ 1
Macrophages infectés	64 $\pm$ 2	83 $\pm$ 2
<i>Activité spécifique</i>	59 $\pm$ 2	79 $\pm$ 2***

Tableau 15B. Après vaccination et infection

	Activité β glucuronidase (%)	
	Splénocytes NV	Splénocytes SAG1
Macrophages non infectés	6 $\pm$ 1	5 $\pm$ 1
Macrophages infectés	50 $\pm$ 2	58 $\pm$ 2
<i>Activité spécifique</i>	44 $\pm$ 2	53 $\pm$ 2*

Les résultats sont la moyenne $\pm$ SE de 4 réplicats de coculture de cellules effectrices avec des macrophages infectés ou non infectés (ratio 10:1). Témoins NV = Témoins non vaccinés.

L'activité cytotoxique spécifique est définie comme la différence d'activité mesurée vis-à-vis des macrophages infectés et des macrophages non infectés.

L'analyse statistique est réalisée avec le test *t* de Student : ****p*<0,001; **p*<0,05.

5.2. Rôle des sous-populations lymphocytaires CD4+ et CD8+

Pour identifier la sous-population lymphocytaire T responsable de l'activité cytotoxique mesurée avec les splénocytes totaux, les expériences précédentes sont reproduites en déplaçant les lymphocytes T CD4+ ou CD8+ *in vitro* ou *in vivo* après la vaccination.

- **L'activité cytotoxique est médiée par les lymphocytes T CD8+.**

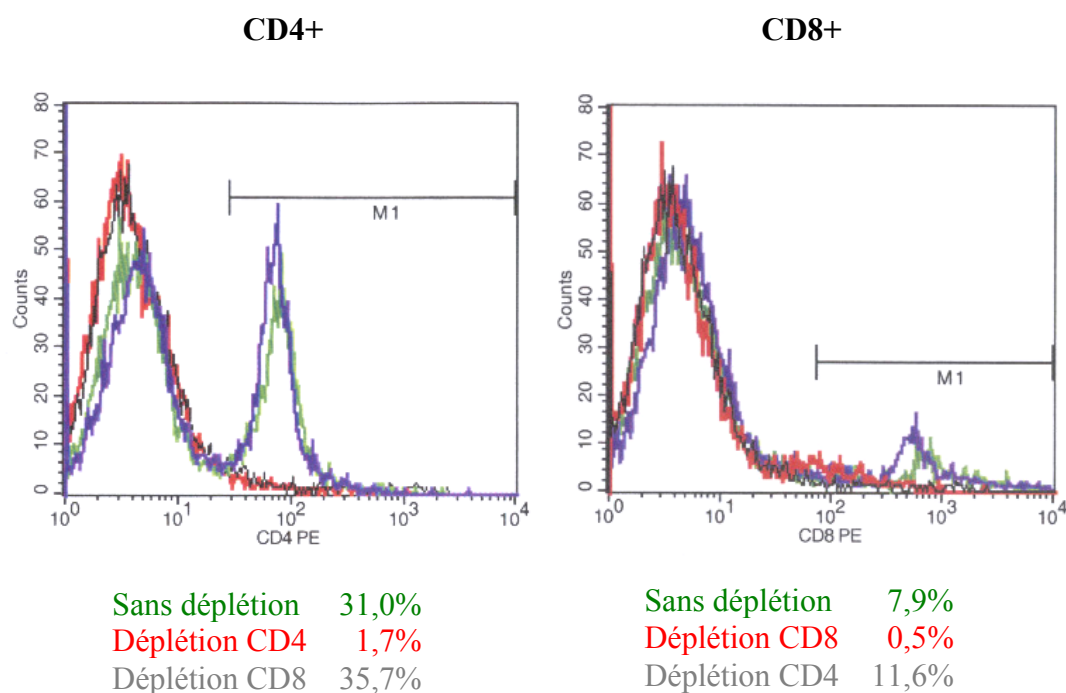
Dans un premier temps, les lymphocytes T CD4+ ou CD8+ sont déplaçés *in vitro* à partir de splénocytes de souris vaccinées mais non infectées. Les splénocytes sont prélevés 20 jours après la dernière immunisation avec SAG1 et stimulés *in vitro* pendant 96 heures avec de l'AST. Les sous-populations lymphocytaires T CD4+ ou CD8+ sont déplaçées juste avant le test par addition de l'anticorps monoclonal correspondant suivie d'une lyse par du complément. La déplétion vérifiée en cytométrie en flux et s'avère supérieure à 90% (figure 7). Inversement, la déplétion des lymphocytes T CD4+ enrichit de 47% la sous-population CD8+ et la déplétion des lymphocytes T CD8+ enrichit de 16% la sous-population CD4+.

La déplétion des lymphocytes T CD8+ réduit de 56% l'activité cytotoxique des splénocytes de souris vaccinées vis-à-vis des macrophages infectés ($p=0,0005$) (tableau 16A). Au contraire, la déplétion de la sous-population lymphocytaire T CD4+ ne modifie pas l'activité cytotoxique des splénocytes (+4%, $p=0,7449$). Ces données suggèrent que l'activité cytotoxique des splénocytes vis-à-vis des macrophages infectés est médiée par la sous-population lymphocytaire T CD8+ après vaccination avec SAG1.

Dans un second temps, les lymphocytes T CD4⁺ ou CD8⁺ sont déplétés *in vivo* chez la souris vaccinée gestante, avant l'infection, selon le protocole décrit précédemment. Les splénocytes sont prélevés à J7 postinfection et testés immédiatement après séparation des fractions adhérentes et non adhérentes. La déplétion des lymphocytes T CD8⁺ réduit de 73% l'activité cytotoxique des splénocytes des souris vaccinées ($p=0,0003$) (tableau 16B). La déplétion des lymphocytes T CD4⁺ ne modifie pas l'activité cytotoxique des splénocytes ($p=0,3319$).

Ces résultats, observés après vaccination et après vaccination puis infection, confirment que, dans notre modèle, la vaccination avec SAG1 induit une activité effectrice cytotoxique vis-à-vis des macrophages infectés médiée par la sous-population lymphocytaire T CD8⁺.

Figure 7. Quantification des lymphocytes T CD4+ et CD8+ splénocytaires après déplétion *in vitro* des sous-populations CD4+ ou CD8+.



— Isotype contrôle

Les splénocytes sont prélevés 20 jours après la dernière immunisation avec SAG1 et cultivés 96 heures avec 0,1 µg/ml d'AST avant d'être déplétés en lymphocytes T CD4+ ou CD8+. Les comptages par cytométrie en flux sont réalisés sur 10000 cellules.

Tableau 16. Activité cytotoxique des splénocytes après déplétion des lymphocytes T CD4+ ou CD8+.

Tableau 16A. Déplétion des lymphocytes T CD4+ ou CD8+ *in vitro*.

	Activité β glucuronidase			
	Témoins NV	SAG1 Totaux	SAG1 + anti-CD4	SAG1 + anti-CD8
Macrophages non infectés	5 $\pm$ 1	4 $\pm$ 1	4 $\pm$ 1	6 $\pm$ 1
Macrophages infectés	69 $\pm$ 4	89 $\pm$ 5	92 $\pm$ 7	43 $\pm$ 5
Activité spécifique	64 $\pm$ 4	85 $\pm$ 5	88 $\pm$ 7	37 $\pm$ 5***

Tableau 16B. Déplétion des lymphocytes T CD4+ ou CD8+ *in vivo*.

	Activité β glucuronidase			
	Témoins NV	SAG1	SAG1 + anti-CD4	SAG1 + anti-CD8
Macrophages non infectés	5 $\pm$ 1	4 $\pm$ 1	4 $\pm$ 1	5 $\pm$ 1
Macrophages infectés	60 $\pm$ 8	78 $\pm$ 7	89 $\pm$ 5	25 $\pm$ 1
Activité spécifique	55 $\pm$ 8	74 $\pm$ 7	85 $\pm$ 5	20 $\pm$ 1***

Les résultats sont la moyenne $\pm$ SE de 4 réplicats de coculture de cellules effectrices avec des macrophages infectés ou non infectés (ratio 10:1). Témoins NV = Témoins non vaccinés.

L'activité cytotoxique spécifique est définie comme la différence d'activité mesurée vis-à-vis des macrophages infectés et des macrophages non infectés.

L'analyse statistique est réalisée avec le test *t* de Student par rapport au groupe "SAG1 totaux" (tableau 16A) et "SAG1" (tableau 16B) : ****p*<0,001.

5.3. Rôle de l'IFN γ

Dans les expériences précédentes, la cytotoxicité des lymphocytes T de souris vaccinées était accompagnée d'une augmentation de la concentration d'IFN γ dans l'environnement des cellules cytotoxiques avant et pendant la lyse des macrophages infectés. Ces résultats suggèrent que l'IFN γ pourrait participer à l'activation des cellules cytotoxiques dans notre modèle. Pour explorer cette hypothèse, l'activité cytotoxique des splénocytes est mesurée après neutralisation de l'IFN γ *in vitro* et *in vivo*.

- **La neutralisation de l'IFN γ *in vitro* réduit l'activité cytotoxique des splénocytes de souris vaccinées**

Le rôle de l'IFN γ est d'abord étudié sur les splénocytes de souris vaccinées non infectées. L'IFN γ est neutralisé dans l'environnement de culture des splénocytes en ajoutant un anticorps monoclonal anti-IFN γ en excès dans le milieu de culture 30 minutes avant de mesurer l'activité cytotoxique des cellules.

L'absence d'IFN γ dans le surnageant de coculture est vérifié par ELISA avant le test et à l'issue des 4 heures de contact entre les cellules effectrices et les macrophages infectés. L'expérience est répétée deux fois.

Les résultats montrent que la neutralisation de l'IFN γ réduit de 56% l'activité cytotoxique des splénocytes de souris vaccinées ($p=0,0002$) (tableau 17A).

- **La neutralisation de l'IFN γ *in vivo* avant l'infection réduit l'activité cytotoxique des splénocytes de souris vaccinées**

Le rôle de l'IFN γ est confirmé *in vivo* dans notre modèle d'infection congénitale en neutralisant l'IFN γ 24 heures avant et 3 jours après l'infection selon le protocole

précédemment décrit. Les splénocytes sont prélevés et analysés à J7 postinfection. L'expérience est répétée deux fois.

L'activité cytotoxique de la fraction non adhérente des splénocytes est réduite 60% par la neutralisation de l'IFN γ ($p < 0,0001$) (tableau 17B). L'analyse des cellules par cytométrie en flux montre que le nombre total des lymphocytes T CD4 $^{+}$ et CD8 $^{+}$ n'est pas modifié par le traitement avec l'anticorps anti-IFN γ (données non montrées).

Tableau 17. Activité cytotoxique des splénocytes après neutralisation de l'IFN γ .

Tableau 17A. Neutralisation de l'IFN γ *in vitro*.

Cellules cibles	Activité β glucuronidase		
	Témoins NV	SAG1	SAG1 + anti-IFN γ
Macrophages non infectés	6 $\pm$ 1	4 $\pm$ 1	6 $\pm$ 1
Macrophages infectés	84 $\pm$ 7	101 $\pm$ 6	49 $\pm$ 3
<i>Activité spécifique</i>	78 $\pm$ 7	97 $\pm$ 6	43 $\pm$ 3***

Tableau 17B. Neutralisation de l'IFN γ *in vivo*.

Cellules cibles	Activité β glucuronidase		
	Témoins NV	SAG1	SAG1 + anti-IFN γ
Macrophages non infectés	5 $\pm$ 1	4 $\pm$ 1	6 $\pm$ 1
Macrophages infectés	79 $\pm$ 3	107 $\pm$ 5	47 $\pm$ 2
<i>Activité spécifique</i>	75 $\pm$ 3	103 $\pm$ 5	42 $\pm$ 2***

Les résultats sont la moyenne $\pm$ SE de 4 réplicats de coculture de cellules effectrices avec des macrophages infectés ou non infectés (ratio 10:1). Témoins NV = Témoins non vaccinés.

L'activité cytotoxique spécifique est définie comme la différence d'activité mesurée vis-à-vis des macrophages infectés et des macrophages non infectés.

L'analyse statistique est réalisée avec le test *t* de Student en comparaison avec le groupe SAG1 : ****p*<0,0001.

V. ACTIVITE TOXOPLASMICIDE DES MACROPHAGES

Les macrophages jouent un rôle important au cours de l'infection toxoplasmique. Ils sont à la fois des cellules cibles du parasite qui est capable de s'y multiplier et des cellules effectrices toxoplasmicides lorsqu'ils sont activés.

L'effet de la vaccination sur l'activité toxoplasmicide des macrophages est étudiée *in vitro* en mesurant la capacité des macrophages péritonéaux résidents à contrôler la multiplication des parasites intracellulaires. Les macrophages sont prélevés 7 jours après la dernière immunisation et sont infectés avec des tachyzoïtes de souche RH pendant 2 heures. Les parasites extracellulaires sont éliminés par lavage et la culture est prolongée pendant 16 heures supplémentaires. Le pourcentage de macrophages infectés est compté au microscope et les parasites sont dénombrés par PCR quantitative après les 2 heures initiales et après l'incubation finale de 18 heures.

- **Les macrophages des souris vaccinées contrôlent la réplication des parasites intracellulaires.**

Après 2 heures de contact, le taux d'infection des macrophages est comparable dans les groupes contrôle et vacciné ($80 \pm 3\%$ vs $70 \pm 3\%$, $p=0,0612$). A l'issue des 18 heures d'incubation, le taux d'infection des macrophages contrôles n'est pas modifié ($+ 6\%$, $p=0,0944$). Au contraire, le nombre de macrophages infectés est diminué de 24% dans le groupe SAG1 ($p=0,0014$) (figure 8A).

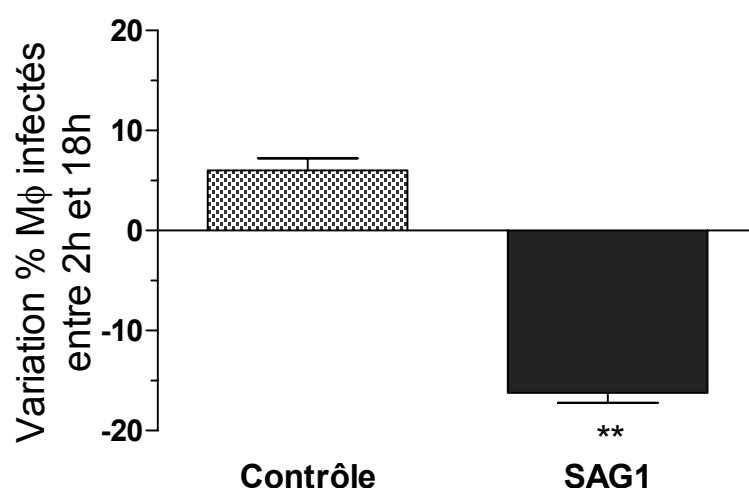
Le dénombrement des parasites par PCR dans les puits de culture à 2 heures et 18 heures est représenté sur la figure 8B. Après 2 heures d'incubation, le nombre de parasites est comparable dans les 2 groupes ($p=0,3193$). Après 18 heures d'incubation, le nombre de parasites est significativement plus élevé dans les macrophages contrôles que dans les

macrophages du groupe vacciné ($p=0,0010$). Le facteur multiplicatif des parasites est de 7,6 dans les macrophages contrôle ($p=0,0048$ entre 2h et 18h) et de 0,9 dans les macrophages du groupe vacciné ($p=0,5187$ entre 2h et 18h). L'observation microscopique confirme que, à 2 heures comme à 18 heures, tous les parasites sont intracellulaires et qu'il n'y a pas de destruction des macrophages après 18 heures d'incubation.

L'absence de multiplication parasitaire dans les macrophages des souris vaccinées suggère que ceux-ci sont capables de contrôler la réplication des parasites qui les infectent. La diminution du nombre de macrophages infectés suggère en plus une activité toxoplasmicide.

Figure 8. Activité toxoplasmicide des macrophages de souris vaccinées.

Figure 8A. Evolution du nombre de macrophages infectés après 18 heures d'incubation.

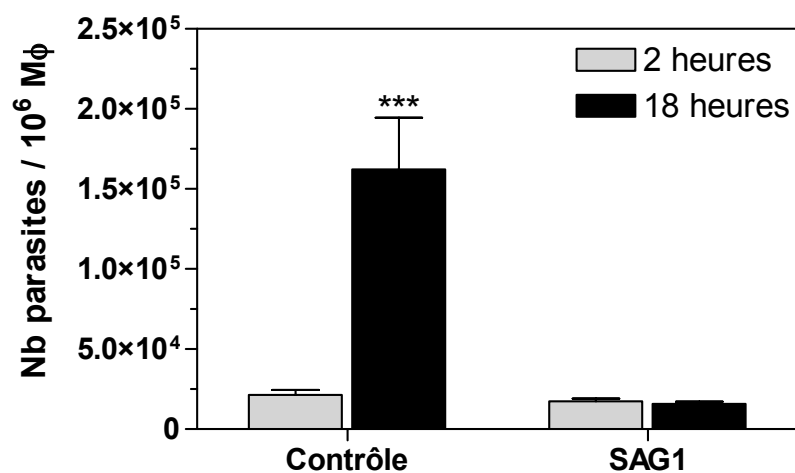


Le pourcentage de macrophages infectés est calculé après 2 heures et après 18 heures d'incubation par comptage microscopique de 400 macrophages par réplicat. Trois réplicats sont comptés pour chaque groupe à 2 heures et à 18 heures.

Les résultats présentés sont la moyenne $\pm$ SE du différentiel d'infection des macrophages entre 2 heures et 18 heures (% de macrophages infectés à 18h - % de macrophages infectés à 2h) sur 3 réplicats.

L'analyse statistique est réalisée par le test *t* de Student : ** $p < 0,001$.

Figure 8B. Dénombrement des parasites dans les cultures de macrophages après 2 heures et 18 heures d'incubation.



Les parasites sont dénombrés après 2 heures et après 18 heures d'incubation par amplification du gène SAG2 en PCR quantitative.

Les résultats présentés sont la moyenne $\pm$ SE de 3 réplicats.

L'analyse statistique est réalisée par le test *t* de Student : ****p*<0,0001.

DISCUSSION

Les objectifs de notre travail étaient d'évaluer les propriétés vaccinales de la protéine de surface SAG1 de *T. gondii* dans un modèle de toxoplasmose congénitale chez la souris puis de caractériser les mécanismes immunologiques humoraux et cellulaires maternels qui sous-tendent la protection vaccinale.

La protéine SAG1 a été retenue pour ce travail car elle est aujourd'hui bien caractérisée tant sur le plan structural que sur le plan de son activité immunomodulatrice. SAG1 possède plusieurs caractéristiques qui en font un candidat vaccin intéressant. C'est la protéine la plus abondante du parasite (5% des protéines parasitaires) (Kasper *et al.*, 1983) et sa structure est très conservée entre les différentes souches parasitaires (Windeck et Gross, 1996). Ancrée sous forme homodimérique à la surface des tachyzoïtes par une ancre GPI (He *et al.*, 2002), SAG1 est impliquée à la fois dans la reconnaissance et l'attachement du parasite aux cellules cibles (Robinson *et al.*, 2004), et dans l'activation précoce de la réponse immunitaire (Kasper et Khan, 1993; Seng *et al.*, 2004). Elle génère une réponse immunitaire intense, à la fois humorale et cellulaire. Elle induit la production de titres élevés d'anticorps chez l'homme et est reconnue par 100 % des sérums de sujets séropositifs en phase aiguë ou chronique de l'infection (Potasman *et al.*, 1986). Des lymphocytes prélevés chez des sujets séropositifs et stimulés *in vitro* avec SAG1 produisent des titres élevés d'IFN γ (Khan *et al.*, 1988). Expérimentalement, des splénocytes de souris immunisées par SAG1 sont capables de lyser des tachyzoïtes extracellulaires (Khan *et al.*, 1988) ainsi que des macrophages infectés (Kasper *et al.*, 1992) et cet effet cytotoxique est médié par des lymphocytes T CD8⁺ spécifiques. Ces observations sont intéressantes dans la mesure où il est admis que l'immunité protectrice vis à vis de *T. gondii* passe par une production d'IFN γ (Suzuki *et al.*, 1988) et par les effecteurs cellulaires macrophagiques et lymphocytaires T CD8⁺ (Gazzinelli *et al.*, 1993; Hunter *et al.*, 1996).

Plusieurs études de vaccination avec la protéine SAG1 couplée à des adjuvants Th1 inducteurs (Bonenfant *et al.*, 2001; Bulow et Boothroyd, 1991; Debard *et al.*, 1996; Khan *et al.*, 1991; Letscher-Bru *et al.*, 1998) ou plus récemment des vaccins ADN incluant le gène SAG1 (Angus *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2002; Couper *et al.*, 2003; Nielsen *et al.*, 1999) ont démontré leur efficacité dans des modèles de toxoplasmose aiguë en dehors de la gestation. En revanche, les études de vaccination dans des modèles de toxoplasmose congénitale sont rares car elles sont délicates à mettre en œuvre et se heurtent à la difficulté d'établir des modèles animaux comparables à l'infection humaine et au manque de connaissance des mécanismes qui contrôlent le passage transplacentaire du parasite.

Dans notre modèle, les souris sont vaccinées selon un protocole court sur deux semaines avec la protéine seule sans adjuvant, et infectées quatre semaines après la dernière immunisation. Nous avons choisi un modèle d'infection orale par des kystes de la souche de type II ME49, d'une part pour mimer le principal mode de contamination humaine, et d'autre part parce que les souches de type II sont les plus fréquemment impliquées dans les infections congénitales chez l'homme (Ajzenberg *et al.*, 2002). Nous avons retenu une date d'infection au deuxième tiers de la gestation, selon le modèle proposé par Roberts et Alexander (Roberts et Alexander, 1992), qui se traduit par un pourcentage élevé de fœtus infectés sans avortements ni mortalité maternelle. Les fœtus et les placentas sont prélevés *in utero* le dernier jour de la gestation, juste avant la mise bas, ce qui empêche d'évaluer la mortalité *in utero* et la gravité clinique de l'atteinte fœtale mais permet d'éviter des biais difficiles à maîtriser, la transmission du parasite par l'allaitement après la mise bas habituellement nocturne et la mortalité néonatale liée au transfert de la portée chez une mère adoptive allaitante (Eichenwald, 1948).

Immunogénicité et protection chez les souris BALB/c et CBA/J vaccinées avec SAG1

Dans cette première partie de notre travail, nous avons caractérisé la réponse immunitaire induite par la vaccination avec SAG1 chez la souris non gestante non infectée et évalué la protection vaccinale dans un modèle de toxoplasmose congénitale en utilisant deux souches de souris ayant des fonds génétiques différents, la souris BALB/c (H2^d) et la souris CBA/J (H2^k).

L'influence du fond génétique sur la réponse immunitaire et sur la susceptibilité aux infections est bien établie dans de nombreux modèles. Chez la souris, la présence de certains gènes des régions H-2 du CMH modifie la réponse immunitaire et la résistance à l'infection toxoplasmique (Blackwell *et al.*, 1993; Suzuki *et al.*, 1991; Williams *et al.*, 1978). Les souris BALB/c (H2^d) sont résistantes à l'infection en phase aiguë et chronique alors que les souris CBA/J (H2^k) sont résistantes en phase aiguë mais sensibles en phase chronique de l'infection. Ces deux souches de souris présentent également une susceptibilité différente à l'infection congénitale. Chez la souris BALB/c, une primoinfection toxoplasmique induit une réponse immunitaire protectrice qui bloque complètement la transmission du parasite aux fœtus en cas de réinfection pendant la gestation (Abou-Bacar *et al.*, 2004; Roberts et Alexander, 1992). Au contraire, chez la souris CBA/J, la primoinfection ne confère aucune protection et la transmission maternofoetale du parasite se reproduit lors de chaque réinfection (données personnelles). Ces données de transmission parasitaire dans un contexte de réinfection ont été préalablement vérifiées dans nos conditions expérimentales avant de débiter les protocoles de vaccination (données non montrées).

Les résultats de cette première partie de notre travail montrent que la vaccination avec une très faible quantité (4 x 1 µg) de protéine SAG1 recombinante réduit de plus de 50% la transmission maternofoetale de *T. gondii* lors d'une primo-infection chez la souris BALB/c gestante. Au contraire chez la souris CBA/J le passage transplacentaire du parasite est facilité et augmente de plus de 50%. Plusieurs études déjà anciennes avaient démontré une protection partielle avec les souches mutées de toxoplasme vivant ts4 (McLeod *et al.*, 1988) et S48 (Buxton *et al.*, 1991) ou des mélanges antigéniques complexes combinés à des véhicules lipidiques (Roberts *et al.*, 1994) ou liposomaux (Elsaid *et al.*, 2001). Seules deux études récentes ont évalué à ce jour la protéine SAG1, l'une sous forme de protéine recombinante (Haumont *et al.*, 2000), l'autre sous forme de plasmide (Couper *et al.*, 2003). Les résultats apparaissent contradictoires. Haumont *et al.* ont obtenu une protection partielle chez le cobaye immunisé avec une protéine SAG1 recombinante associée à un adjuvant Th1. Dans le groupe vacciné, l'incidence de l'infection chez les nouveau-nés vivants était significativement réduite (34% contre 83% dans le groupe contrôle) et 31% des portées étaient totalement exemptes d'infection contre 0% dans le groupe contrôle (Haumont *et al.*, 2000). La protéine SAG1 seule sans adjuvant n'a pas été évaluée dans cette étude. Au contraire, Couper *et al.* n'ont observé aucune modification du nombre de nouveau-nés vivants infectés chez la souris BALB/c immunisée avec un plasmide contenant le gène SAG1 (Couper *et al.*, 2003). La vaccination induisait des titres élevés en IgG2a et en IgG1 spécifiques sans production mesurable de cytokines chez la souris non gestante et non infectée. La réponse immunitaire maternelle n'a pas été évaluée après l'infection.

Dans notre modèle BALB/c, la baisse de la transmission maternofoetale du parasite chez les souris vaccinées est associée à une stimulation mixte de la réponse immunitaire maternelle, à la fois Th1 (IFN γ augmenté, production d'IgG2a) et Th2 (IL10 augmentée, production

massive d'IgG1). Au contraire, dans le modèle CBA/J, l'augmentation de la transmission verticale du parasite chez les animaux vaccinés est associée à une réponse maternelle uniquement Th2. Ces profils de réponse immunitaire après infection sont superposables, bien qu'amplifiés, à ceux observés chez les souris vaccinées non gestantes non infectées. Après immunisation, les souris BALB/c présentent une réponse immunitaire mixte, avec des quantités élevées d'IgG1, de faibles quantités d'IgG2a et une augmentation de la capacité de production de l'IFN γ . Les souris CBA/J vaccinées présentent au contraire une réponse immunitaire exclusivement Th2 avec une production d'IgG1 sans IgG2a et une baisse de la capacité de production d'IL2 et d'IFN γ .

Le rôle majeur de la réponse Th1 est largement démontré dans la toxoplasmose acquise en dehors de la gestation. Dans ce contexte, les cytokines Th1, IFN γ et IL2, ont un effet protecteur via l'activation de l'immunité cellulaire et des macrophages (Sharma *et al.*, 1985; Suzuki *et al.*, 1988) alors qu'une production excessive de cytokines Th2, IL4 ou IL10, est délétère (Gazzinelli *et al.*, 1992; Villard *et al.*, 1995). Les données établies en dehors de la gestation doivent cependant être extrapolées avec prudence aux modèles congénitaux car la gestation modifie la balance naturelle entre les réponses immunitaires Th1 et Th2 en générant un environnement Th2 indispensable à son maintien (Lin *et al.*, 1993; Ng *et al.*, 2002).

Nos résultats vont dans le sens d'un effet vaccinal protecteur lié à une réponse Th1 car l'effet délétère de la vaccination chez la souris CBA/J est associé à une stimulation isolée de la réponse Th2 alors que la protection partielle obtenue dans le modèle BALB/c associe une stimulation de la composante Th1. Comme Roberts *et al.* (Roberts *et al.*, 1994), nous avons observé une augmentation de la production d'IFN γ associée à une baisse de la transmission maternofoetale du parasite. Le rôle de l'IFN γ paraît ambivalent au cours d'une infection toxoplasmique pendant la gestation. Abou-Bacar a récemment démontré chez la souris

BALB/c infectée au douzième jour de gestation que l'IFN γ facilite le passage transplacentaire du parasite au cours d'une primo-infection et, au contraire, est protecteur au cours d'une réinfection (Abou-Bacar *et al.*, 2004). L'exploration plus précise du rôle de l'IFN γ dans notre modèle vaccinal et les résultats seront discutés plus loin.

La transmission verticale du parasite pourrait également être partiellement sous la dépendance de l'IL4 comme le suggère la baisse de la transmission du parasite aux fœtus chez les souris BALB/c IL4^{-/-} par rapport aux animaux IL4^{+/+} (Thouvenin *et al.*, 1997). Nos résultats vont dans le même sens, l'augmentation du passage transplacentaire du parasite chez la souris CBA/J vaccinée étant associée à une forte augmentation de l'IL4 sérique.

Le rôle de l'IL10 apparaît moins clair. Dans notre modèle, nous avons observé une augmentation de la production d'IL10 aussi bien chez les souris CBA/J que BALB/c vaccinées. Cette cytokine est abondamment produite à l'interface fœto-maternel sous l'action de la progestérone et est strictement indispensable au maintien de la gestation (Chaouat *et al.*, 1995; Saito, 2000). Une production importante d'IL10 est théoriquement défavorable au cours de la toxoplasmose car cette cytokine régule négativement la réponse Th1 et bloque l'activité toxoplasme des macrophages infectés (Gazzinelli *et al.*, 1992). Au cours de la gestation, l'IL10 pourrait être responsable de l'augmentation de la susceptibilité maternelle à l'infection toxoplasmique (Thouvenin *et al.*, 1997). En revanche, son rôle dans le contrôle de la transmission maternofoetale du toxoplasme n'est pas connu. Chez la souris BALB/c IL4^{-/-}, le passage transplacentaire du parasite est diminué par rapport aux animaux IL4^{+/+} malgré des concentrations plus élevées d'IL10 (Thouvenin *et al.*, 1997). Dans notre modèle BALB/c, l'IL10 est également augmentée dans le groupe vacciné. Outre ses fonctions de maintien de la gestation, l'IL10 pourrait exercer une action bénéfique dans ce contexte, en stimulant

localement l'activité cytotoxique des cellules NK placentaires (Vigano *et al.*, 2001) ou, par son activité anti-inflammatoire, en diminuant l'adhésion des cellules infectées aux cellules trophoblastiques par le biais d'une réduction de l'expression des molécules d'adhésion à la surface des cellules trophoblastiques, comme cela a été décrit pour *Plasmodium* sp. (Maubert *et al.*, 1997).

Dans nos deux modèles, BALB/c et CBA/J, la vaccination par SAG1 induit une production importante d'anticorps spécifiques. Comme déjà décrit (Haumont *et al.*, 2000; Letscher-Bru *et al.*, 1998; Petersen *et al.*, 1998), la protéine utilisée sans adjuvant induit majoritairement des IgG1 et l'infection ne modifie pas ce profil. Nous avons cependant mesuré une production d'IgG2a après l'infection chez la souris BALB/c mais pas chez la souris CBA/J. Le rôle des anticorps induits par la vaccination n'est pas clair. La plupart des études de vaccination avec SAG1 en dehors de la gestation ont mesuré des IgG spécifiques totales et n'ont retrouvé aucune relation entre le titre des anticorps et l'efficacité vaccinale (Bulow et Boothroyd, 1991; Haumont *et al.*, 2000; Khan *et al.*, 1991). Ces observations n'excluent pas un rôle des anticorps lors d'une infection survenant pendant la gestation car la contamination fœtale se produit directement à partir des parasites circulants dans le sang maternel pendant la phase parasitémique. Nous avons observé une diminution d'environ 80% du nombre de parasites circulants dans le sang maternel chez les souris BALB/c vaccinées. Bien que le parasite semble circuler dans le sang sous forme intraleucocytaire, associé aux cellules dendritiques, les anticorps pourraient en accélérer la clairance et réduire ainsi le nombre de parasites arrivant au placenta.

Nous avons poursuivi notre travail dans le modèle BALB/c exclusivement, celui-ci s'avérant plus proche de l'infection humaine que le modèle CBA/J dans la mesure où une

primoinfection contractée avant la gestation induit une immunité protectrice en cas de réinfection pendant la gestation. Nous avons successivement exploré le rôle de l'immunité humorale et de l'immunité cellulaire dans la protection vaccinale obtenue avec la protéine SAG1 dans ce modèle.

Rôle de l'immunité humorale dans la protection vaccinale conférée par la protéine SAG1

Le rôle des anticorps au cours de la toxoplasmose est mal élucidé et reste controversé car il est classiquement admis que, même si l'infection induit une intense production d'anticorps, l'effecteur majeur de la réponse protectrice est l'immunité cellulaire en raison du caractère intracellulaire obligatoire de *T. gondii*.

Pour explorer le rôle de l'immunité humorale dans la protection vaccinale observée avec SAG1 chez la souris BALB/c, nous avons dans un premier temps réalisé des transferts passifs d'anticorps polyclonaux et monoclonaux anti-SAG1 avant l'infection.

Dans la littérature, les études de transfert passif d'anticorps sont pour la plupart anciennes et leurs résultats contradictoires. Les premiers travaux utilisant du sérum d'animaux infectés n'ont mis en évidence aucun effet protecteur (Foster et McCulloch, 1968; Krahenbuhl *et al.*, 1972; Nakayama, 1965). Plus tard, Pavia a cependant observé une diminution significative de la charge parasitaire dans les organes et de la mortalité en transférant du sérum immun à des cobayes concomitamment à l'infection (Pavia, 1986; Pavia *et al.*, 1992). Dans ce modèle, les animaux donneurs étaient eux-mêmes résistants à une réinfection, ce qui suggère la présence possible d'anticorps protecteurs dans leur sérum. Une protection significative en termes de survie et de charge parasitaire dans les organes a également été obtenue avec des anticorps

monoclonaux reconnaissant des protéines de surface de poids moléculaire 14 et 35 kDa (Johnson *et al.*, 1983) et plus récemment avec un anticorps monoclonal anti-SAG1 (Cha *et al.*, 2001). Des discordances d'effet entre les anticorps monoclonaux et le sérum ont été observées pour d'autres pathogènes intracellulaires, notamment *Mycobacterium tuberculosis* (Teitelbaum *et al.*, 1998), *Listeria monocytogenes* (Edelson *et al.*, 1999) ou *Histoplasma capsulatum* (Nosanchuk *et al.*, 2003). Elles pourraient être liées à l'hétérogénéité quantitative et qualitative des anticorps présents dans le sérum immun car celui-ci contient un panel d'anticorps de différentes spécificités, de différents isotypes et de différentes affinités, parmi lesquels peuvent coexister des anticorps protecteurs et facilitants. Plus récemment, des études utilisant des souris génétiquement déficientes en lymphocytes B ont confirmé le rôle de l'immunité humorale (Chen *et al.*, 2003; Kang *et al.*, 2000; Sayles *et al.*, 2000). Ces souris se sont avérées plus sensibles à l'infection aiguë que les souches sauvages correspondantes malgré une production normale d'IFN γ et la présence de lymphocytes T CD8⁺ (Kang *et al.*, 2000). La résistance à l'infection était restaurée par le transfert de lymphocytes B sensibilisés (Chen *et al.*, 2003) et par le transfert d'anticorps spécifiques (Kang *et al.*, 2000).

Dans notre modèle, le transfert passif des anticorps anti-SAG1 polyclonaux et monoclonaux, mais aussi celui des anticorps contrôles, réduit significativement la transmission parasitaire, de 28% à 59% selon les groupes, par rapport au groupe témoin non transféré. L'effet protecteur des anticorps apparaît donc partiellement non spécifique. Bien que la différence entre l'effet des anticorps spécifiques et contrôles ne soit pas statistiquement significative, la baisse de la transmission parasitaire est toujours plus importante avec les anticorps anti-SAG1. Parallèlement, la baisse de la transmission parasitaire est associée à une diminution significative de la parasitémie avec les anticorps contrôles et à une parasitémie indétectable avec les anticorps anti-SAG1. L'action protectrice des anticorps pourrait donc passer par une

diminution du nombre de parasites atteignant le placenta, l'infection placentaire étant le prérequis indispensable à l'infection foetale. Dans notre modèle, tous les placentas étaient infectés dans tous les groupes, mais l'infection placentaire et l'infection foetale ont été évaluées par une technique de subinoculation qui ne permet pas de quantifier la charge parasitaire.

L'effet protecteur non spécifique que nous avons observé s'est avéré reproductible tant pour les anticorps polyclonaux que pour les anticorps monoclonaux ce qui suggère qu'il ne s'agit pas d'un biais lié à une spécificité particulière des anticorps contrôles. Le chauffage du sérum contenant les anticorps polyclonaux contrôles pendant 30 minutes à 56°C ne modifie pas son activité ce qui élimine un rôle du complément. Cette protection non spécifique n'a été décrite dans aucune des études de la littérature bien que toutes aient inclus des groupes contrôles transférés avec des anticorps non spécifiques. Ces études ont toutefois, pour la plupart, évalué l'impact des anticorps dans des modèles de survie après infection avec des souches hautement virulentes ou avec un inoculum massif, alors que nous avons évalué le rôle des anticorps dans le contrôle du passage transplacentaire du parasite après infection orale avec un inoculum non létal. Il s'agit donc d'un modèle différent, tant sur le plan de la charge parasitaire administrée que sur le plan de la physiopathologie de l'infection évaluée.

Nous avons réalisé parallèlement des transferts passifs avec des isotypes IgG1 et IgG2a anti-SAG1 car la vaccination induit des titres élevés d'IgG1 et des titres faibles d'IgG2a. Les IgG1 monoclonales anti-SAG1 et les IgG polyclonales anti-SAG1 qui contiennent essentiellement des IgG1 s'avèrent significativement plus efficaces que les IgG2a et permettent d'obtenir un degré de protection proche de celui obtenu avec la vaccination. La différence d'efficacité entre les IgG1 et les IgG2a anti-SAG1 pourrait s'expliquer par une fixation sur des récepteurs FcγR différents, par des différences d'affinité pour le parasite ou par la nature de l'épitope reconnu

par l'IgG2a monoclonale que nous avons utilisée. Chez la souris comme chez l'homme, il existe trois types de récepteurs pour le fragment Fc des IgG dont les ligands et la répartition cellulaire différent (Pleass et Woof, 2001). FcγRI n'est exprimé que sur les monocytes/macrophages et sur les polynucléaires neutrophiles activés par l'IFNγ, FcγRII est présent sur les monocytes/macrophages, les polynucléaires neutrophiles et éosinophiles, les plaquettes et les lymphocytes B, FcγRIII est encore plus largement distribué, sur les macrophages, les polynucléaires et les cellules NK. Ces récepteurs sont également présents à la surface de cellules non immunitaires. Leurs spécificités de ligands sont encore mal connues et pourraient expliquer les différences d'activité des différents isotypes. Des différences d'efficacité d'isotypes différents dirigés contre un même épitope ont également été mises en évidence pour d'autres microorganismes comme *Plasmodium falciparum* (Ferreira *et al.*, 1998) ou *Cryptococcus neoformans* (Yuan *et al.*, 1998) mais le mécanisme précis de ces différences d'activité n'est pas connu.

Chez l'homme, l'infection du placenta puis du fœtus par les tachyzoïtes se produit pendant la phase de parasitémie maternelle. Durant cette phase, les parasites sont des cibles possibles pour les anticorps présents dans le sang maternel. La phase parasitémique est précoce et transitoire. Elle débute dès les premières heures ou les premiers jours après la contamination et dure en moyenne 10 à 15 jours. Lors d'une primo-infection, les anticorps n'apparaissent progressivement qu'à la fin de la phase parasitémique ce qui limite leur rôle dans le contrôle de l'infection transplacentaire. Au contraire, lors d'une réinfection ou après une vaccination, la réponse secondaire se met en place en quelques jours. Des quantités massives d'IgG sont produites rapidement et peuvent alors participer au contrôle des parasites circulants.

Les mécanismes d'action des anticorps sont multiples et diffèrent selon la localisation intra- ou extracellulaire des parasites. D'une manière générale, les anticorps agissent principalement sur les microorganismes extracellulaires en augmentant leur phagocytose par les macrophages et les polynucléaires, en activant la voie classique lytique du complément, en neutralisant diverses fonctions du pathogène telles que sa multiplication, l'attachement ou l'envahissement cellulaire, ou en neutralisant des produits excrétés tels que des toxines. Les anticorps sont également capables d'agir indirectement sur les microorganismes intracellulaires en permettant la destruction des cellules infectées par les macrophages et les cellules NK via un mécanisme cytotoxique de type ADCC, en activant les fonctions microbicides des cellules, en modulant la production de cytokines ou de chémokines proinflammatoires par les cellules sur lesquelles ils se fixent (Casadevall, 1998; Casadevall et Pirofski, 2004) ou en favorisant la mise en place précoce d'une réponse Th1 via la fixation des complexes immuns sur les FcR des cellules phagocytaires présentatrices d'antigène (Igiertseme *et al.*, 2004; Moore *et al.*, 2003). Certains de ces mécanismes ont été décrits pour *T. gondii* (Erbe *et al.*, 1991; Joiner *et al.*, 1990; Kang *et al.*, 2000; Nakao et Konishi, 1991; Wilson *et al.*, 1980). Enfin, récemment, il a été suggéré dans un modèle d'infection à *Listeria monocytogenes* que les anticorps pourraient entrer dans les cellules infectées par un mécanisme d'endocytose indépendant des récepteurs pour le Fc et permettre à la cellule infectée de détruire la bactérie (Edelson et Unanue, 2001).

Nous avons étudié et mis en évidence *in vitro* trois mécanismes d'action des anticorps sur les parasites extracellulaires.

L'opsonisation des parasites par les IgG2a anti-SAG1, mais non par les IgG1 anti-SAG1 ou les anticorps contrôles, entraîne leur lyse par activation de la voie classique du complément. La lyse des parasites extracellulaires par le complément est connue depuis longtemps

(Schreiber et Feldman, 1980). Ce mécanisme est dépendant de l'isotype de l'immunoglobuline. Chez la souris, seuls les isotypes IgG2 et IgG3 activent la voie classique (Schreiber et Feldman, 1980). Le sérum de souris vaccinées qui contient presque exclusivement des IgG1 n'induit pas de lyse des parasites ce qui suggère que ce mécanisme d'action est mineur dans la protection vaccinale observée dans notre modèle. Ceci n'exclut pas d'autres mécanismes d'action du complément que nous n'avons pas explorés, tels que ceux médiés par l'activation de la voie alterne du complément. Les anticorps contrôles n'ont démontré aucun effet dans ce mécanisme qui passe par le pontage entre le microorganisme fixé par le fragment Fab et le complément fixé par le fragment Fc de l'IgG.

Le second mécanisme que nous avons mis en évidence est une augmentation de la phagocytose des parasites par les macrophages après opsonisation par les anticorps anti-SAG1 polyclonaux ou monoclonaux. Les IgG1 sont significativement plus efficaces que les IgG2a mais comme pour les expériences de transfert passif, cette différence est difficile à interpréter car elle peut être liée à l'IgG2a monoclonale choisie, et notamment à son affinité pour SAG1. Les anticorps contrôles ne présentent aucune activité opsono-phagocytaire.

La phagocytose est délicate à mesurer car l'internalisation des parasites résulte de deux mécanismes différents, la phagocytose et l'entrée active du parasite. La part respective des deux mécanismes varie selon la nature et le degré d'activation des cellules utilisées. Des travaux antérieurs ont montré que les monocytes humains non activés (Erbe *et al.*, 1991; Wilson et Remington, 1979) ainsi que les macrophages activés de souris (Remington *et al.*, 1972) sont spontanément capables de phagocyter directement les parasites en l'absence d'anticorps spécifiques et, en fonction des modèles expérimentaux, de bloquer leur répllication ou de les détruire. Pour ces cellules, l'opsonisation augmente l'efficacité de la phagocytose sans toutefois augmenter l'activité toxoplasmicide de la cellule (Erbe *et al.*, 1991; Fadul *et al.*,

1995). Au contraire, les parasites pénètrent activement dans les polynucléaires neutrophiles (Nakao et Konishi, 1991) et macrophages non activés humains (Anderson et Remington, 1974) ou murins (Remington *et al.*, 1972) et s'y multiplient. L'opsonisation préalable des parasites redirige leur internalisation vers un mécanisme de phagocytose médiée par le récepteur FcR et suivi d'une destruction (Anderson *et al.*, 1976; Hauser et Remington, 1981) par activation du métabolisme oxydatif des cellules (Wilson *et al.*, 1980) ou par fusion entre la vacuole parasitophore qui protège le parasite intracellulaire et les lysosomes (Joiner *et al.*, 1990; Nakao et Konishi, 1991).

Nous avons travaillé avec des macrophages non activés donc permissifs à l'invasion parasitaire et, au contraire des travaux précédents, nous n'avons pas pu évaluer l'effet des anticorps anti-SAG1 sur la phagocytose des parasites vivants. En effet, des essais préalables avaient montré que l'opsonisation des tachyzoïtes vivants réduisait le nombre de parasites intra-macrophagiques (données non montrées). Ce phénomène pourrait être lié à la permissivité des macrophages utilisés, pour lesquels l'entrée active prédomine largement sur la phagocytose qui devient alors non évaluable en microscopie. Toutefois dans la mesure où plusieurs travaux de la littérature ont observé une augmentation de la phagocytose avec des sérums immuns contenant un panel d'anticorps dirigés contre différents antigènes parasitaires, l'effet d'inhibition que nous avons observé paraît plus probablement lié à la spécificité anti-SAG1 des anticorps testés. Un effet similaire déjà été rapporté avec des anticorps monoclonaux anti-SAG1 (Cha *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2001). La protéine SAG1 étant directement impliquée dans l'invasion cellulaire, l'effet d'inhibition observé avec les anticorps anti-SAG1 résulterait alors d'une action sur l'entrée active du parasite et non sur la phagocytose (Grimwood et Smith, 1996). Nos résultats, bien qu'obtenus avec des tachyzoïtes inactivés, confirment que les anticorps anti-SAG1 sont capables de faciliter la phagocytose par opsonisation. L'absence de phagocytose mesurable *in vitro* sur des parasites vivants

n'exclut pas un rôle de la phagocytose *in vivo* car, chez la souris vaccinée, l'IFN γ produit dans les premiers jours de l'infection pourrait activer les cellules phagocytaires, diminuer leur perméabilité au parasite et restaurer leurs fonctions phagocytaires.

Le troisième mécanisme que nous avons mis en évidence est une activité neutralisante des anticorps anti-SAG1 sur l'entrée active des tachyzoïtes dans les cellules trophoblastiques humaines BeWo. Un effet neutralisant partiel, de l'ordre de 50%, avait déjà été démontré avec des anticorps anti-SAG1 sur plusieurs autres lignées cellulaires (Grimwood et Smith, 1996; Petersen *et al.*, 1998), notamment sur des entérocytes qui sont la première ligne cellulaire envahie par le parasite après une infection orale (Mineo *et al.*, 1993). Dans le cas de l'infection congénitale, les parasites doivent franchir les cellules placentaires avant d'atteindre le fœtus. Nous avons donc évalué l'action des anticorps sur l'invasion des cellules de la lignée trophoblastique BeWo par le parasite. Le blocage de l'invasion des cellules BeWo atteint 86% avec les anticorps polyclonaux anti-SAG1, 79% pour les IgG1 et 75% pour les IgG2a monoclonales anti-SAG1.

Le blocage de l'entrée du parasite dans les cellules placentaires pourrait être un mécanisme important de la protection vaccinale car l'envahissement des cellules placentaires se fait à partir des tachyzoïtes circulants dans le sang maternel et précède l'infection fœtale. Les tachyzoïtes extracellulaires pénètrent dans les cellules en moins d'une minute (Morisaki *et al.*, 1995). La protéine SAG1 est clairement impliquée dans le processus d'invasion comme le démontrent les études d'inhibition en préincubant les parasites avec des anticorps anti-SAG1 (Grimwood et Smith, 1996; Mineo *et al.*, 1993; Petersen *et al.*, 1998) ou en préincubant les cellules avec de la protéine SAG1 libre (Velge-Roussel *et al.*, 2001). Le mécanisme d'action précis de SAG1 n'est cependant pas clairement élucidé. Récemment Robinson *et al.* ont

montré que SAG1 permettrait l'attachement du parasite sur la cellule cible par liaison à la glucosamine (Robinson *et al.*, 2004).

Le blocage de l'invasion cellulaire par les anticorps anti-SAG1 n'est jamais complet ce qui suggère que d'autres mécanismes existent, indépendants de SAG1. L'utilisation de parasites mutants nuls SAG1^{-/-} confirme que l'invasion cellulaire est toujours possible, bien que réduite de 40% environ par rapport à la souche sauvage SAG1^{+/+} (Mineo et Kasper, 1994). Les protéines SAG2 et SAG3 pourraient être impliquées (Grimwood et Smith, 1996; Jacquet *et al.*, 2001), ainsi que des protéines de surface SRS. Velge-Roussel *et al.* ont montré que l'invasion de différentes lignées cellulaires était partiellement inhibée par l'incubation préalable des parasites avec des anticorps dirigés contre un peptide de 41 acides aminés correspondants aux résidus 125 à 165 de SAG1 (Velge-Roussel *et al.*, 2001). Cette séquence peptidique est hautement conservée parmi la superfamille des protéines de surface SRS ce qui suggèrent que ces protéines pourraient, comme SAG1, contribuer à l'invasion cellulaire.

L'effet neutralisant que nous avons observé avec les cellules BeWo s'avère partiellement non spécifique, comme lors des expériences de transfert passif d'anticorps chez la souris. *In vitro*, les anticorps contrôles réduisent significativement l'invasion cellulaire par rapport au témoin sans anticorps, avec un blocage moyen de 39% pour les anticorps polyclonaux, de 59% pour les IgG1 et de 46% pour les IgG2a monoclonales. Ce blocage non spécifique est néanmoins toujours significativement plus faible que celui observé avec les anticorps anti-SAG1.

Les trophoblastes étant capables de phagocytose, cet effet pourrait résulter d'une inhibition de la phagocytose par recouvrement des parasites par les anticorps. Cette hypothèse semble improbable car dans nos conditions expérimentales, les cellules BeWo n'ont démontré aucune capacité de phagocytose ou d'opsono-phagocytose sur des parasites inactivés (données non

montrées). La diminution du nombre de parasites intracellulaires observé en présence des anticorps résulte donc bien d'un blocage de l'entrée active des parasites.

Vercammen *et al.* ont également observé une activité neutralisante non spécifique sur des cellules Vero et sur des macrophages murins en primoculture (Vercammen *et al.*, 1999) et ont émis l'hypothèse que cet effet était médié par la fixation des anticorps non spécifiques sur les récepteurs pour le Fc des immunoglobulines présents à la surface des parasites (Budzko *et al.*, 1989; Vercammen *et al.*, 1998). Des récepteurs fixant le Fc des IgG et/ou des IgM ont été identifiés à la surface de nombreux parasites (Pleass et Woof, 2001). Leur rôle n'est pas clairement élucidé car la fixation des immunoglobulines de l'hôte à la surface des parasites peut être favorable pour le parasite comme pour l'hôte. Cette fixation peut favoriser l'infectivité des parasites intracellulaires ou leur échappement à la réponse immunitaire de l'hôte comme cela a été décrit pour les trypanosomes (Rodriguez *et al.*, 1991). Inversement, elle peut également favoriser la réponse de l'hôte en neutralisant certaines fonctions parasitaires comme cela a été décrit par Vercammen pour le toxoplasme (Vercammen *et al.*, 1999).

La fixation des anticorps non spécifiques à la surface des parasites sur les récepteurs pour le Fc des IgG semble être à l'origine de l'activité non spécifique que nous avons observée car le clivage du fragment Fc annule complètement l'activité neutralisante des anticorps contrôle alors qu'il est sans effet sur l'activité des anticorps anti-SAG1. Le mécanisme précis par lequel la fixation des anticorps non spécifiques sur le parasite limite l'invasion cellulaire n'a pas été exploré dans ce travail. Il pourrait toutefois s'agir d'un phénomène d'encombrement stérique ou de masquage des sites de fixation du parasite aux cellules cibles.

Rôle de l'immunité cellulaire dans la protection vaccinale conférée par la protéine SAG1

Le rôle protecteur de l'immunité cellulaire lors d'une infection toxoplasmique acquise en dehors de la gestation est bien établi (Denkers, 1999). La réponse protectrice Th1 résulte d'une synergie entre les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ (Gazzinelli *et al.*, 1992; Gazzinelli *et al.*, 1991; Suzuki et Remington, 1988). Chez la souris, les effecteurs majeurs de cette réponse sont les lymphocytes T CD8⁺ et l'IFN γ (Parker *et al.*, 1991; Suzuki *et al.*, 1988).

Dans cette partie de notre travail nous avons exploré le rôle de l'immunité cellulaire spécifique dans la protection vaccinale conférée par SAG1. Nous avons plus précisément étudié le rôle des lymphocytes T et des sous-populations CD4⁺ et CD8⁺ ainsi que de l'IFN γ , d'abord *in vivo* par des expériences de transfert adoptif et de déplétion/neutralisation chez la souris gestante, puis *in vitro* en étudiant les fonctions cytotoxiques des lymphocytes T.

Le transfert adoptif de splénocytes de souris vaccinées avec SAG1 confère une protection partielle en diminuant de 37% le nombre de fœtus infectés par rapport au groupe contrôle traité avec des splénocytes de souris non vaccinées, ce qui suggère que l'immunité vaccinale est transférable par les lymphocytes T. La protection n'est toutefois pas statistiquement significative, peut-être en raison du petit nombre de fœtus analysés (33 fœtus dans le groupe transféré avec les splénocytes de souris vaccinées et 42 fœtus dans le groupe transféré avec les splénocytes de souris non vaccinées), d'un nombre de lymphocytes T spécifiques transférés trop faible ou prélevés à un moment inapproprié par rapport à la vaccination. Lepage *et al.* ont démontré que, dans le cas des lymphocytes intra-épithéliaux isolés de l'intestin de souris infectées par voie orale avec des kystes de *T. gondii*, l'activité protectrice des lymphocytes

transférés variait non seulement par rapport à la date de l'infection des souris donneuses mais aussi selon le fond génétique et la susceptibilité à l'infection des souris (Lepage *et al.*, 1998).

Dans cette expérience, nous avons transféré des splénocytes totaux qui contiennent non seulement des lymphocytes T mais aussi des lymphocytes B sensibilisés capables de produire rapidement des anticorps spécifiques protecteurs et des cellules NK dont le rôle effecteur a été démontré en primo-infection (Abou-Bacar *et al.*, 2004; Denkers *et al.*, 1993). Nous ne pouvons donc pas exclure la participation de ces cellules dans la protection obtenue.

Pour vérifier plus précisément le rôle des lymphocytes T chez les souris vaccinées avec SAG1, nous avons déplété les sous-populations lymphocytaires TCD4⁺ ou CD8⁺ juste avant l'infection. La déplétion des lymphocytes T CD8⁺ abolit complètement la protection vaccinale et augmente le nombre de parasites circulants dans le sang maternel à J7 postinfection. Inversement, la déplétion des lymphocytes T CD4⁺ ne modifie pas la protection vaccinale. Ces résultats indiquent que les lymphocytes T CD8⁺ sont des effecteurs majeurs de la protection vaccinale induite par SAG1 chez la souris gestante. Les lymphocytes T CD4⁺ n'ont pas démontré de rôle effecteur direct pendant la phase de l'infection, ce qui n'exclut pas un rôle immunomodulateur avant l'infection et ce point sera discuté plus loin.

Ces résultats obtenus après vaccination avec SAG1 sont superposables à ceux récemment obtenus au laboratoire par Abou-Bacar *et al.* chez la souris BALB/c chroniquement infectée avant la gestation puis réinfectée pendant la gestation (Abou-Bacar *et al.*, 2004). Dans ce modèle, la réinfection orale à J12 de gestation par une souche de type II n'entraîne aucune infection foetoplacentaire et aucun parasite n'est détectable dans le sang maternel au septième jour de l'infection. La déplétion des lymphocytes T CD8⁺ juste avant l'infection, mais pas celle des lymphocytes T CD4⁺, entraîne un passage transplacentaire du parasite associé à une réapparition des parasites dans le sang maternel.

Nos résultats sont également concordants avec ceux de modèles vaccinaux chez la souris non gestante. Des études de vaccination avec la souche mutée ts4 de *T. gondii* (Gazzinelli *et al.*, 1991; Suzuki et Remington, 1988), avec la protéine SAG1 associée à une saponine, le Quil A (Khan *et al.*, 1991), et avec un plasmide codant la protéine GRA1 (Scorza *et al.*, 2003) avaient montré que la protection vaccinale en phase aiguë de l'infection était abolie par la déplétion de la sous-population lymphocytaire T CD8⁺ et restait inchangée après déplétion des lymphocytes T CD4⁺. La protection vaccinale était par ailleurs transférable à des animaux naïfs par les splénocytes des animaux vaccinés et plus spécifiquement par la sous-population lymphocytaire T CD8⁺ (Khan *et al.*, 1991; Khan *et al.*, 1994; Suzuki et Remington, 1988). Buzoni-Gatel et son groupe ont également démontré que le transfert adoptif de lymphocytes T α/β ⁺ CD8⁺ intra-épithéliaux isolés de l'intestin de souris infectées oralement protégeait significativement et durablement les souris receveuses (Buzoni-Gatel *et al.*, 1997; Lepage *et al.*, 1998). L'origine de ces cellules n'est pas claire et l'apparition de lymphocytes intra-épithéliaux spécifiques suivie de leur localisation dans la muqueuse intestinale ne semble pas limitée aux antigènes et microorganismes acquis par voie digestive (Kim *et al.*, 1997). Sydora *et al.* ont observé la présence de lymphocytes intra-épithéliaux spécifiques dans l'intestin des animaux après infection systémique par le virus de la chorioméningite lymphocytaire (Sydora *et al.*, 1996). Il est possible que, dans notre modèle vaccinal, l'injection de SAG1 par voie sous-cutanée induise également des lymphocytes T α/β ⁺ CD8⁺ intra-épithéliaux spécifiques se localisant secondairement dans la muqueuse intestinale où ils pourraient limiter la dissémination des parasites administrés par voie orale.

Dans notre modèle, comme dans d'autres modèles vaccinaux chez la souris non gestante (Gazzinelli *et al.*, 1991; Nakao et Konishi, 1991; Scorza *et al.*, 2003), la déplétion des lymphocytes T CD4⁺ juste avant l'infection ne modifie pas la protection vaccinale, ce qui

suggère que ces cellules ne sont pas des effecteurs directs dans le contrôle de la transmission maternofoetale du parasite pendant les sept premiers jours de l'infection. Ils sont en revanche indispensables au développement et au maintien d'une immunité protectrice durable. Les souris génétiquement déficientes en CMH II (Denkers et Gazzinelli, 1998) ou en lymphocytes T CD4⁺ (Casciotti *et al.*, 2002) ou déplétées en lymphocytes T CD4⁺ (Araujo, 1992) survivent à la phase aiguë de l'infection mais décèdent au début de la phase chronique avec une charge parasitaire élevée après infection avec une souche de *T. gondii* de type II. De la même manière, la vaccination avec la souche ts4 de *T. gondii* n'induit aucune protection chez la souris déficiente en lymphocytes T CD4⁺ (Johnson et Sayles, 2002) ou traitée avec un anticorps monoclonal anti-CD4 pendant la phase de vaccination (Gazzinelli *et al.*, 1991). Les lymphocytes T CD8⁺ effecteurs sont induits et activés par l'IL2 et l'IFN γ produits par les lymphocytes T CD4⁺ auxiliaires. Toutefois, plusieurs travaux réalisés dans différents modèles d'infection par des microorganismes intracellulaires suggèrent que, en l'absence de lymphocytes T CD4⁺ auxiliaires, des lymphocytes T CD8⁺ protecteurs peuvent être induits transitoirement pendant la phase aiguë de l'infection sous l'effet de l'IL2 et de l'IFN γ produits par les cellules de la réponse non spécifique, et en particulier par les cellules NK et NKT (Buller *et al.*, 1987; Casciotti *et al.*, 2002; Denkers et Sher, 1997; Doolan et Hoffman, 1999; Moretto *et al.*, 2000; Rahemtulla *et al.*, 1991).

Parallèlement à la protection vaccinale, nous avons comparé le profil de production de l'IFN γ , de l'IL4 et de l'IL10 dans les différents groupes expérimentaux à J7 postinfection. La déplétion des lymphocytes T CD4⁺ réduit de 20% la concentration sérique d'IFN γ et de 70% la production spécifique d'IFN γ par les splénocytes cultivés en présence d'antigène toxoplasmique, par rapport au groupe contrôle vacciné non déplété, ce qui suggère que les lymphocytes T CD4⁺ sont une source importante mais non unique d'IFN γ . En revanche la

déplétion des lymphocytes T CD8⁺ ne modifie ni les concentrations sériques ni la production spécifique d'IFN γ par les splénocytes, ce qui indique que les lymphocytes T CD8⁺ ne sont pas une source majeure d'IFN γ à ce stade de l'infection. Ces résultats diffèrent de ceux observés par Abou-Bacar *et al.* chez la souris BALB/c réinfectée pendant la gestation, chez qui l'IFN γ était produit conjointement par les lymphocytes T CD4⁺ et les lymphocytes T CD8⁺ (Abou-Bacar *et al.*, 2004). De même, Gazzinelli *et al.* avaient retrouvé une production d'IFN γ par les lymphocytes T CD8⁺, celle-ci restant toutefois plus faible que celle des lymphocytes T CD4⁺, après vaccination avec la souche ts4 de *T. gondii* (Gazzinelli *et al.*, 1991). Cette différence avec nos résultats pourrait s'expliquer par le fait que, dans ces deux modèles, la réponse immunitaire spécifique était induite par du toxoplasme entier, vivant ou muté, donc par un panel complexe d'antigènes alors que nous avons utilisé une protéine unique. Il est également possible que, dans notre modèle, en l'absence de lymphocytes T CD8⁺, la production d'IFN γ soit assurée par d'autres cellules comme les cellules NK et NKT (Denkers et Sher, 1997; Sher *et al.*, 1993), les polynucléaires neutrophiles (Bliss *et al.*, 1999) ou éventuellement les cellules dendritiques (Ohteki *et al.*, 1999) pendant la phase précoce de l'infection.

En revanche, la déplétion des lymphocytes T CD8⁺ augmente massivement la concentration d'IL4 sérique et plus faiblement sa production par les splénocytes restimulés avec de l'antigène toxoplasmique, ce qui pourrait suggérer la disparition d'un mécanisme de régulation de la production d'IL4 dépendant des lymphocytes T CD8⁺. L'IL4 n'est produite que par un nombre restreint de cellules, les polynucléaires basophiles, les mastocytes, les cellules NKT et les lymphocytes T CD4⁺ ou CD8⁺ de phénotype Th2. L'origine de l'IL4 dans notre modèle n'est pas claire et n'a pas été explorée. La déplétion des lymphocytes T CD8⁺ ne modifie pas la production de l'IL10 dans nos conditions expérimentales.

Le rôle protecteur l'IFN γ au cours de l'infection toxoplasmique aiguë et chronique est établi depuis longtemps en dehors de la gestation par des expériences de neutralisation (Shirahata *et al.*, 1994; Suzuki *et al.*, 1988), de traitement par de l'IFN γ recombinant (McCabe *et al.*, 1984) et par l'utilisation d'animaux génétiquement déficients en IFN γ (Scharton-Kersten *et al.*, 1996). Pour explorer la discordance apparente dans notre modèle entre la perte de la protection vaccinale dans le groupe déplété en lymphocytes T CD8 $^{+}$ et une production d'IFN γ normale à J7 postinfection, nous avons suivi la cinétique d'apparition des cytokines dans le sérum des souris entre J1 et J7 postinfection. Les résultats montrent une inversion de la cinétique de production des cytokines Th1 et Th2 en l'absence de lymphocytes T CD8 $^{+}$, avec une production retardée d'IFN γ à J7, et au contraire, une production plus précoce d'IL4 et d'IL10, respectivement à J1 et J3. Cette inversion de la cinétique des cytokines Th1/Th2 pourrait contribuer à la perte de la protection vaccinale en favorisant la transmission parasitaire dès les premiers jours de l'infection, lorsque l'IFN γ n'est pas encore présent. La production précoce de l'IFN γ est cruciale au cours de l'infection aiguë. Shirahata *et al.* ont montré la neutralisation de l'IFN γ avant le quatrième jour de l'infection exacerbe l'infection dans un modèle de toxoplasmose aiguë chez la souris, alors que sa neutralisation au-delà du quatrième jour n'a que peu d'effet immédiat (Shirahata *et al.*, 1994; Shirahata *et al.*, 1994). Un rôle de l'IL4 sur le contrôle de la transmission maternofoetale du parasite est également possible et avait déjà été évoqué par Thouvenin *et al.*, qui avaient constaté que la transmission parasitaire était diminuée de moitié chez la souris BALB/c IL4 $^{-/-}$ primoinfectée par rapport à la souris BALB/c IL4 $^{+/+}$ (Thouvenin *et al.*, 1997). Un rôle facilitant de l'IL4 a également été proposé au cours de l'infection congénitale à *Neospora caninum* chez la souris. Dans ce modèle, la transmission maternofoetale du parasite était associée à une production massive d'IL4 (Quinn *et al.*, 2004) et la neutralisation de l'IL4 par un anticorps monoclonal avant l'infection réduisait la transmission parasitaire (Long et Baszler, 2000). Dans notre modèle

vaccinal, la neutralisation l'IL4 au moment de l'infection ou la vaccination de souris IL4^{-/-} pourrait permettre d'explorer plus avant cette hypothèse.

Pour explorer plus précisément le rôle de l'IFN γ dans le contrôle de la transmission verticale du parasite dans notre modèle, nous avons neutralisé l'IFN γ au moment de l'infection chez la souris vaccinée. Les résultats montrent une disparition complète de la protection vaccinale ce qui confirme le rôle crucial de cette cytokine dans la réponse vaccinale induite par SAG1. D'autres travaux de vaccination avec la souche ts4 de *T. gondii* avaient déjà démontré le rôle de l'IFN γ dans la protection vaccinale. La neutralisation de l'IFN γ après la vaccination (Gazzinelli *et al.*, 1991) ou après transfert de lymphocytes T de souris vaccinées (Suzuki et Remington, 1990) abolissait complètement la protection vaccinale. Peu de données existent sur le rôle de l'IFN γ dans la transmission maternofoetale de *T. gondii* pendant la gestation. Abou-Bacar *et al.* ont décrit chez la souris BALB/c un rôle facilitant inattendu sur le passage transplacentaire du parasite au cours de la primo-infection maternelle, par un mécanisme non encore élucidé. Au contraire, dans un contexte de réinfection, l'IFN γ s'est avéré protecteur, sa neutralisation entraînant l'apparition de parasites dans le sang maternel et leur transmission aux fœtus (Abou-Bacar *et al.*, 2004).

Il est classiquement admis que, chez la souris infectée par *T. gondii*, l'activité protectrice des lymphocytes T CD8⁺ peut passer par deux mécanismes, la production d'IFN γ qui active ensuite l'activité toxoplasmicide des macrophages, et une activité cytotoxique sur les cellules infectées. La cytotoxicité cellulaire peut résulter de deux mécanismes différents (Griffiths, 1995). Le premier est l'exocytose des granules cytotoxiques contenant de la perforine et des granzymes inducteurs de l'apoptose cellulaire. Le second induit également l'apoptose de la cellule infectée par l'interaction entre les molécules Fas Ligand sur la cellule cible et Fas sur

la cellule cytotoxique. Le mécanisme Fas-Fas Ligand est restreint aux cellules cibles portant Fas Ligand à leur surface, essentiellement les cellules du système immunitaire. Le système perforine-granzymes peut virtuellement détruire n'importe quelle cible cellulaire.

Nous avons exploré l'activité cytotoxique granulaire des lymphocytes T spléniques des souris vaccinées avec SAG1 en mesurant l'activité β glucuronidase relarguée dans le surnageant de coculture des cellules effectrices et des cellules cibles infectées. Cette enzyme est contenue dans les granules cytotoxiques et son apparition dans le surnageant témoigne de l'exocytose des granules. Nos résultats montrent que les splénocytes des souris vaccinées exercent une activité cytotoxique significative sur des macrophages infectés avec des tachyzoïtes de *T. gondii*, et que cette activité est exclusivement médiée par les lymphocytes T CD8+.

Chez la souris, seule la sous-population lymphocytaire T CD8+ a démontré une activité cytotoxique vis-à-vis de cellules infectées par *T. gondii*, après vaccination avec la souche ts4 de *T. gondii* (Hakim *et al.*, 1991; Subauste *et al.*, 1991) et après vaccination avec la protéine SAG1 associée à du Quil A (Kasper *et al.*, 1992). Récemment, Nakano *et al.* ont montré que l'activité cytotoxique de lymphocytes T CD8+ de souris vaccinées avec des bradyzoïtes de souche Beverley et de l'antigène soluble de souche RH était inhibée par la concanamycine A, un inhibiteur de la perforine, mais pas par un anticorps monoclonal anti-Fas Ligand, ce qui indique que l'activité cytotoxique passait par la voie granulaire (Nakano *et al.*, 2001). Les lymphocytes T CD8+ intra-épithéliaux isolés de l'intestin de souris infectées par voie orale ont également démontré une activité cytotoxique vis-à-vis d'entérocytes infectés (Buzoni-Gatel *et al.*, 1997). Enfin, deux études déjà anciennes avaient démontré une activité cytotoxique directe des splénocytes de souris vaccinées avec SAG1 sur des tachyzoïtes de souche RH (Khan *et al.*, 1988; Khan *et al.*, 1990). Cette cytotoxicité directe sur les parasites libres était indépendante des cellules NK, de l'opsonisation par les anticorps et, bien que

médiée par une population cellulaire CD3⁺ CD8⁺ CD4⁻, n'était pas restreinte au CMH ce qui suggère qu'il pourrait s'agir non pas de lymphocytes T CD8⁺ mais de cellules CIK (cytokine induced killer cells) induites par la présence de concentrations élevées en IL2 et IFN γ chez les animaux vaccinés (Schmidt-Wolf *et al.*, 1997).

Si chez la souris, toutes les études publiées montrent de manière homogène que seuls les lymphocytes T CD8⁺ exercent une activité cytotoxique vis-à-vis des cellules parasitées par *T. gondii*, chez l'homme en revanche, des études réalisées avec des cellules mononuclées périphériques prélevées chez des sujets en phase chronique de toxoplasmose ont retrouvé une activité cytotoxique médiée conjointement par les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ (Montoya *et al.*, 1996; Purner *et al.*, 1996). La participation réelle de lymphocytes T CD4⁺ cytotoxiques chez l'homme doit cependant encore être confirmée car les cellules mononuclées des donneurs ont été restimulées *in vitro* avec des cellules mononuclées infectées par des parasites tués, ce qui peut conduire à une présentation des antigènes parasitaires majoritairement par le CMH II et donc augmenter de manière artificielle l'activation des lymphocytes T CD4⁺.

Dans notre modèle comme dans celui de Nakano *et al.* (Nakano *et al.*, 2001), l'activité cytotoxique des lymphocytes T CD8⁺ s'avère partiellement dépendante de l'IFN γ . La neutralisation de l'IFN γ *in vitro* ou *in vivo* réduit de moitié l'activité cytotoxique des splénocytes des souris vaccinées. L'IFN γ pourrait stimuler l'activité cytotoxique des lymphocytes T CD8⁺ soit indirectement en augmentant l'expression du CMH I à la surface des cellules infectées (Boehm *et al.*, 1997), soit directement (Ely *et al.*, 1999).

Les conséquences de l'action des cellules cytotoxiques sur la viabilité des parasites contenus dans les cellules cibles sont encore mal connues. Les données actuellement disponibles suggèrent que les parasites intracellulaires ne sont pas tués après destruction de la cellule hôte

par les lymphocytes T CD8+ (Yamashita *et al.*, 1998) bien que leur capacité répliquative des parasites intracellulaires soit réduite (Nakano *et al.*, 2001). Bien qu'on ne puisse exclure que la destruction des cellules infectées par l'action des lymphocytes T CD8+ cytotoxiques puisse participer à la dissémination parasitaire chez la souris, d'autres études sont nécessaires pour éclaircir ce point. Dans tous les cas, la libération des parasites dans le milieu extracellulaire les expose alors à d'autres mécanismes effecteurs tels que les anticorps, le complément, la phagocytose par les macrophages ou les polynucléaires neutrophiles ou l'activité cytotoxique directe des cellules NK comme cela a été décrit pour *Leishmania* sp. (Smith *et al.*, 1991).

Activité toxoplasmicide des macrophages



Les macrophages ont un rôle central au cours de l'infection toxoplasmique. Les macrophages non activés sont à la fois des cellules hôtes permissives pour les tachyzoïtes qui s'y multiplient au sein de la vacuole parasitophore, puis deviennent, après activation, des cellules toxoplasmicides efficaces (Anderson et Remington, 1974; Remington *et al.*, 1972). Ils participent à la réponse inflammatoire initiale et contribuent à la mise au place de la réponse immunitaire adaptative en présentant les antigènes toxoplasmiques aux lymphocytes T et en produisant notamment de l'IL12 qui oriente l'immunité vers un profil Th1.

Dans la dernière partie de notre travail nous avons étudié la permissivité au toxoplasme des macrophages péritonéaux résidents de souris vaccinées avec SAG1 prélevés 7 jours après la dernière immunisation, puis infectés *in vitro* avec des tachyzoïtes de souche RH. Le facteur multiplicatif des parasites est de 7,6 dans les macrophages des animaux contrôles après 18 heures d'incubation et de 0,9 dans les macrophages des souris vaccinées, ce qui indique que

ces derniers contrôlent la réplication parasitaire. Parallèlement, le pourcentage de macrophages infectés est significativement plus faible à la 18^{ème} heure d'incubation qu'à la 2^{ème} heure dans les macrophages des souris vaccinées ce qui pourrait suggérer une activité partiellement toxoplasmodicide. Makioka et Kobayashi avaient également observé une activité toxoplasmodicide de macrophages péritonéaux de souris immunisées avec une protéine SAG1 recombinante exprimée sous la forme d'une protéine de fusion GST (Makioka et Kobayashi, 1991). L'effet toxoplasmodicide était beaucoup plus marqué dans leur modèle, peut-être parce que l'immunisation était faite directement par voie intrapéritonéale avec des doses de SAG1 allant jusqu'à 200 µg soit 50 fois plus que la dose vaccinale totale que nous avons utilisée.

Le contrôle de la réplication parasitaire exercé par les macrophages des souris vaccinées avec SAG1 témoigne de leur activation. En effet, il a été démontré que les macrophages murins non activés sont permissifs au toxoplasme alors que les macrophages activés sont capables de bloquer leur multiplication. (Remington *et al.*, 1972). Cette activation pourrait avoir été initiée par l'IFN γ produit pendant la vaccination. Il est établi que l'IFN γ active les fonctions microbicides des macrophages vis-à-vis de nombreux microorganismes intracellulaires (Subauste et Remington, 1991) et que cette activation est augmentée en présence de TNF α autocrine (Langermans *et al.*, 1992).

Plusieurs mécanismes de contrôle de la réplication parasitaire par les macrophages infectés ont été décrits, par production de réactifs nitrés intermédiaires (Adams *et al.*, 1990; Scharon-Kersten *et al.*, 1997) ou oxydatifs (Murray et Cohn, 1979), dégradation du tryptophane indispensable au parasite par activation de l'indolamine 2,3-déoxygénase (MacKenzie *et al.*, 1999; Silva *et al.*, 2002), production de protéines liant le GTP (IGTP et LRG-47) dont le mécanisme d'action exact n'est pas encore élucidé (Collazo *et al.*, 2001).

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Dans ce travail nous avons étudié les propriétés vaccinales de la protéine recombinante SAG1 de *T. gondii* dans un modèle de toxoplasmose congénitale chez la souris. Après avoir étudié le profil de la réponse immunitaire induite par SAG1 et son efficacité vaccinale, nous avons exploré le rôle de l'immunité maternelle humorale et cellulaire dans la protection vaccinale.

Dans la première partie de notre travail, nous avons comparé la réponse à la vaccination avec la protéine SAG1 dans deux souches de souris congéniques ayant des fonds génétiques différents, la souris BALB/c (H2^d) et la souris CBA/J (H2^k).

La vaccination chez la souris non gestante induit une réponse mixte Th1 et Th2 chez la souris BALB/c et Th2 chez la souris CBA/J.

Chez la souris vaccinée puis infectée pendant la gestation, la transmission maternofoetale du parasite est réduite de moitié chez la souris BALB/c et est, au contraire, facilitée chez la souris CBA/J. Ces résultats concordent avec ceux de l'infection toxoplasmique naturelle dans ces deux souches de souris. Chez la souris BALB/c, une primo-infection avant la gestation confère une immunité protectrice qui bloque la transmission verticale du parasite et protège complètement les fœtus en cas de réinfection pendant la gestation alors que, chez la souris CBA/J, la primo-infection ne confère aucune protection et la transmission du parasite aux fœtus se produit de la même manière lors de chaque réinfection.

Le profil de la réponse immunitaire après l'infection reste superposable à celui observé juste après l'immunisation. Chez la souris BALB/c, la réponse associe une composante Th1 (production accrue d'IFN γ) et Th2 (production accrue d'IL10, titres élevés en IgG1 anti-SAG1). Chez la souris CBA/J, la réponse est Th2, avec une augmentation de la production d'IL4 et d'IL10 et la présence d'IgG1 anti-SAG1.

L'effet protecteur de la vaccination chez la souris BALB/c gestante nous a conduit ensuite à explorer les rôles respectifs de l'immunité humorale et cellulaire dans cette souche de souris afin de mieux comprendre les mécanismes de la réponse immunitaire maternelle impliqués dans la protection vaccinale.

Nous avons d'abord exploré le rôle de l'immunité humorale, plus précisément celui des anticorps anti-SAG1, car la protection vaccinale est associée à des titres élevés en IgG1 spécifiques.

Les études de transfert passif d'anticorps polyclonaux ou monoclonaux anti-SAG1 montrent que les anticorps réduisent significativement la transmission maternofoetale du parasite et rendent la parasitémie maternelle indétectable. Les IgG1 s'avèrent plus efficaces que les IgG2a. Nous avons étudié *in vitro* trois mécanismes d'action possibles des anticorps sur les parasites intracellulaires. Les résultats indiquent que dans notre modèle, l'action protectrice des anticorps anti-SAG1 pourrait passer par un blocage de l'entrée active du parasite dans les cellules. Ce blocage pourrait à la fois diminuer l'entrée des parasites libres dans les cellules placentaires, et les maintenir dans une situation extracellulaire défavorable à leur multiplication et qui les expose à l'action du complément et à la phagocytose ou à l'opsonophagocytose. D'autres mécanismes d'action des anticorps que nous n'avons pas explorés pourraient intervenir, notamment des mécanismes cytotoxiques de type ADCC vis-à-vis des cellules infectées par le parasite.

L'effet protecteur des anticorps apparaît toutefois partiellement non spécifique dans notre modèle car les anticorps contrôles polyclonaux ou monoclonaux réduisent également l'infection foetale après transfert passif. La protection est plus faible qu'avec les anticorps anti-SAG1. *In vitro*, les anticorps contrôles réduisent l'invasion cellulaire bien que le blocage soit significativement plus faible qu'avec les anticorps anti-SAG1. Cette activité neutralisante non

spécifique résulte de la fixation des anticorps par leur fragment Fc à la surface des parasites. Bien que le mécanisme précis par lequel cette fixation limite l'invasion cellulaire n'ait pas été exploré dans ce travail, il pourrait s'agir d'un effet d'encombrement stérique limitant l'accès du parasite à la cellule cible.

Nous avons ensuite exploré le rôle de l'immunité cellulaire dans protection vaccinale conférée par la protéine SAG1, en étudiant plus particulièrement le rôle des sous-populations lymphocytaires T CD4⁺ et CD8⁺ ainsi que le rôle de l'IFN γ .

La protection vaccinale induite par SAG1 est transférable à des souris gestantes naïves par les splénocytes des souris vaccinées et est complètement abolie par la déplétion des lymphocytes T CD8⁺ ou de l'IFN γ chez les animaux vaccinés. Le mécanisme d'action des lymphocytes T CD8⁺ dans notre modèle est double. Le premier est une activité cytotoxique, partiellement dépendante de l'IFN γ , sur les cellules infectées. Il a été suggéré que la destruction de la cellule hôte pourrait, en libérant les parasites intracellulaires, contribuer à la dissémination parasitaire (Yamashita *et al.*, 1998). L'étude de la viabilité et l'infectivité des parasites libérés après l'action des lymphocytes T cytotoxiques pourrait apporter des éléments de réponse. Toutefois, dans tous les cas, les parasites libérés dans le milieu extracellulaire seraient alors exposés à l'action du complément et des anticorps. Le second mécanisme d'action des lymphocytes T CD8⁺ dans notre modèle passe par une production précoce d'IFN γ dès le troisième jour de l'infection. Cette production précoce semble cruciale pour contrôler rapidement la dissémination parasitaire. Les mécanismes d'action connus de l'IFN γ sont multiples (Suzuki *et al.*, 1988). Dans notre modèle, l'IFN γ active les fonctions cytotoxiques des lymphocytes T CD8⁺ et est probablement à l'origine de l'activité toxoplasmicide des macrophages que nous avons observée chez les souris vaccinées. L'origine de l'IFN γ n'est pas claire dans notre modèle. Il pourrait s'agir d'une production précoce et transitoire par les lymphocytes T CD8⁺,

ou d'un mécanisme de régulation indirect permettant la production d'IFN γ par d'autres cellules. Chez les souris contrôles non vaccinées, comme chez les souris vaccinées puis déplétées en lymphocytes T CD8+, nous avons retrouvé des concentrations élevées d'IL4, une cytokine Th2 inductrice et Th1 inhibitrice dont le rôle dans le contrôle de la transmission maternofoetale du parasite avait déjà été évoqué (Thouvenin *et al.*, 1997). La neutralisation l'IL4 au moment de l'infection ou la vaccination de souris IL4^{-/-} pourrait permettre d'explorer plus avant cette hypothèse dans notre modèle vaccinal.

Les lymphocytes T CD4+ n'ont pas démontré de rôle effecteur direct sur le contrôle de la transmission parasitaire, bien qu'ils produisent des quantités importantes d'IFN γ . Ceci n'exclut pas un rôle auxiliaire permettant le développement de l'immunité vaccinale et des expériences de déplétion des lymphocytes T CD4+ pendant la phase de vaccination avec SAG1 permettraient de vérifier cette hypothèse.

En conclusion, les mécanismes de l'immunité maternelle qui contribuent à la diminution de la transmission maternofoetale chez la souris vaccinée avec SAG1 sont multiples et font appel à la fois à l'immunité humorale et à l'immunité cellulaire. Dans ce travail, nous n'avons exploré que le versant de l'immunité maternelle car l'étude de la réponse immunitaire placentaire n'était pas l'objet de ce travail. Le placenta est une interface immunitaire complexe et dynamique entre le compartiment maternel et fœtal et doit donc faire l'objet d'études complémentaires. Des travaux sont actuellement en cours au laboratoire pour tenter de comprendre les mécanismes du passage transplacentaire du parasite.

Ces résultats permettent également à présent de développer d'autres approches pour tenter d'augmenter la protection vaccinale partielle obtenue avec la protéine SAG1 dans notre modèle. L'efficacité de SAG1 pourrait être améliorée par la combinaison avec un adjuvant

dont la nature devra être définie dans le contexte immunologique très particulier de la gestation. Des travaux réalisés antérieurement au laboratoire avaient montré que la combinaison de SAG1 avec de l'IL-12 protégeait la mère mais augmentait la transmission maternofoetale dans le même modèle BALB/c (Candolfi *et al.*, 1997), ce qui suggère qu'un adjuvant ayant une composante mixte Th1 et Th2 pourrait s'avérer plus intéressant que les adjuvants fortement Th1 utilisés avec succès en dehors de la gestation. La protection vaccinale pourrait également être augmentée en combinant plusieurs protéines ou associant vaccination protéique et génique, cette dernière pouvant alors apporter la composante Th1 malgré tout nécessaire. Le choix des protéines est vaste. Les protéines GRA sont intéressantes par leur immunogénicité et leur antigénicité (Aubert *et al.*, 2000; Jacobs *et al.*, 1999), et ont largement démontré leur efficacité en dehors de la gestation (Martin *et al.*, 2004; Scorza *et al.*, 2003; Vercammen *et al.*, 2000). Les protéines GRA2 et GRA5 ont également démontré une activité protectrice partielle dans un modèle de toxoplasmose congénitale chez le rat (Zenner *et al.*, 1999). Enfin, l'administration du vaccin par voie entérale pourrait également augmenter l'efficacité vaccinale car elle permettrait de développer une immunité muqueuse, notamment en sensibilisant et en recrutant des lymphocytes T intraépithéliaux, au site même de l'entrée du parasite dans l'organisme maternel et bloquer ainsi sa dissémination de manière très précoce (Lepage *et al.*, 1998).

REFERENCES

1. **Abbasi M., Kowalewska-Grochowska K., Bahar M. A., Kilani R. T., Winkler-Lowen B., Guilbert L. J. (2003).** "Infection of placental trophoblasts by *Toxoplasma gondii*." The Journal of Infectious Diseases, **188**: 608-616.
2. **Abou-Bacar A., Pfaff A. W., Georges S., Letscher-Bru V., Filisetti D., Villard O., Antoni E., Klein J. P., Candolfi E. (2004).** "Role of NK cells and gamma interferon in transplacental passage of *Toxoplasma gondii* in a mouse model of primary infection." Infection and Immunity, **72**: 1397-1401.
3. **Abou-Bacar A., Pfaff A. W., Letscher-Bru V., Filisetti D., Radjapakse R., Antoni E., Villard O., Klein J. P., Candolfi E.** "Kinetics of materno-fetal transmission of *Toxoplasma gondii* in BALB/c mice." Manuscrit en préparation.
4. **Abou-Bacar A., Pfaff A. W., Letscher-Bru V., Filisetti D., Radjapakse R., Antoni E., Villard O., Klein J. P., Candolfi E. (2004).** "Role of gamma interferon and T cells in congenital *Toxoplasma* transmission." Parasite Immunology, **26**, sous presse.
5. **Adams L. B., Hibbs J. B., Taintor R. R., Krahenbuhl J. L. (1990).** "Microbiostatic effect of murine-activated macrophages for *Toxoplasma gondii*." Journal of Immunology, **144**: 2725-2729.
6. **Adjogble K. D., Mercier C., Dubremetz J. F., Hucke C., Mackenzie C. R., Cesbron-Delauw M. F., Daubener W. (2004).** "GRA9, a new *Toxoplasma gondii* dense granule protein associated with the intravacuolar network of tubular membranes." International Journal for Parasitology, **34**: 1255-1264.
7. **Ajzenberg D., Cogne N., Paris L., Bessieres M. H., Thulliez P., Filisetti D., Pelloux H., Marty P., Darde M. L. (2002).** "Genotype of 86 *Toxoplasma gondii* isolates associated with human congenital toxoplasmosis, and correlation with clinical findings." The Journal of Infectious Diseases, **186**: 684-689.
8. **Anderson S. E., Jr., Bautista S. C., Remington J. S. (1976).** "Specific antibody-dependent killing of *Toxoplasma gondii* by normal macrophages." Clinical and Experimental Immunology, **26**: 375-380.
9. **Anderson S. E., Jr., Remington J. S. (1974).** "Effect of normal and activated human macrophages on *Toxoplasma gondii*." The Journal of Experimental Medicine, **139**: 1154-1174.
10. **Angus C. W., Klivington-Evans D., Dubey J. P., Kovacs J. A. (2000).** "Immunization with a DNA plasmid encoding the SAG1 (P30) protein of *Toxoplasma gondii* is immunogenic and protective in rodents." The Journal of Infectious Diseases, **181**: 317-324.
11. **Araujo F. G. (1992).** "Depletion of CD4+ T cells but not inhibition of the protective activity of IFN-gamma prevents cure of toxoplasmosis mediated by drug therapy in mice." Journal of Immunology, **149**: 3003-3007.

12. **Ashkar A. A., Croy B. A. (1999).** "Interferon-gamma contributes to the normalcy of murine pregnancy." Biology of Reproduction, **61**: 493-502.
13. **Aubert D., Maine G. T., Villena I., Hunt J. C., Howard L., Sheu M., Brojanac S., Chovan L. E., Nowlan S. F., Pinon J. M. (2000).** "Recombinant antigens to detect *Toxoplasma gondii*-specific immunoglobulin G and immunoglobulin M in human sera by enzyme immunoassay." Journal of Clinical Microbiology, **38**: 1144-1150.
14. **Barragan A., Sibley L. D. (2002).** "Transepithelial migration of *Toxoplasma gondii* is linked to parasite motility and virulence." Journal of Experimental Medicine, **195**: 1625-1633.
15. **Barragan A., Sibley L. D. (2003).** "Migration of *Toxoplasma gondii* across biological barriers." Trends in Microbiology, **11**: 426-430.
16. **Beaman M. H., Wong S. Y., Remington J. S. (1992).** "Cytokines, *Toxoplasma* and intracellular parasitism." Immunological Reviews, **127**: 97-117.
17. **Beckers C. J., Dubremetz J. F., Mercereau-Puijalon O., Joiner K. A. (1994).** "The *Toxoplasma gondii* rhoptry protein ROP 2 is inserted into the parasitophorous vacuole membrane, surrounding the intracellular parasite, and is exposed to the host cell cytoplasm." The Journal of Cell Biology, **127**: 947-961.
18. **Black M. W., Boothroyd J. C. (2000).** "Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*." Microbiology and Molecular Biology Reviews, **64**: 607-623.
19. **Blackwell J. M., Roberts C. W., Alexander J. (1993).** "Influence of genes within the MHC on mortality and brain cyst development in mice infected with *Toxoplasma gondii*: kinetics of immune regulation in BALB H-2 congenic mice." Parasite Immunology, **15**: 317-324.
20. **Bliss S. K., Zhang Y., Denkers E. Y. (1999).** "Murine neutrophil stimulation by *Toxoplasma gondii* antigen drives high level production of IFN-gamma-independent IL-12." Journal of Immunology, **163**: 2081-2088.
21. **Boehm U., Klamp T., Groot M., Howard J. C. (1997).** "Cellular responses to interferon-gamma." Annual Review of Immunology, **15**: 749-795.
22. **Bohne W., Heesemann J., Gross U. (1993).** "Induction of bradyzoite-specific *Toxoplasma gondii* antigens in gamma interferon-treated mouse macrophages." Infection and Immunity, **61**: 1141-1145.
23. **Bonenfant C., Dimier-Poisson I., Velge-Roussel F., Buzoni-Gatel D., Del Giudice G., Rappuoli R., Bout D. (2001).** "Intranasal immunization with SAG1 and nontoxic mutant heat-labile enterotoxins protects mice against *Toxoplasma gondii*." Infection and Immunity, **69**: 1605-1612.
24. **Bourguin I., Chardes T., Bout D. (1993).** "Oral immunization with *Toxoplasma gondii* antigens in association with cholera toxin induces enhanced protective and cell-mediated immunity in C57BL/6 mice." Infection and Immunity, **61**: 2082-2088.

25. **Budzko D. B., Tyler L., Armstrong D. (1989).** "Fc receptors on the surface of *Toxoplasma gondii* trophozoites: a confounding factor in testing for anti-Toxoplasma antibodies by indirect immunofluorescence." Journal of Clinical Microbiology, **27**: 959-961.
26. **Buller R. M., Holmes K. L., Hugin A., Frederickson T. N., Morse H. C., 3rd (1987).** "Induction of cytotoxic T-cell responses *in vivo* in the absence of CD4 helper cells." Nature, **328**: 77-79.
27. **Bulow R., Boothroyd J. C. (1991).** "Protection of mice from fatal *Toxoplasma gondii* infection by immunization with p30 antigen in liposomes." Journal of Immunology, **147**: 3496-3500.
28. **Burg J. L., Grover C. M., Pouletty P., Boothroyd J. C. (1989).** "Direct and sensitive detection of a pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii*, by polymerase chain reaction." Journal of Clinical Microbiology, **27**: 1787-1792.
29. **Burg J. L., Perelman D., Kasper L. H., Ware P. L., Boothroyd J. C. (1988).** "Molecular analysis of the gene encoding the major surface antigen of *Toxoplasma gondii*." Journal of Immunology, **141**: 3584-3591.
30. **Buxton D., Innes E. A. (1995).** "A commercial vaccine for ovine toxoplasmosis." Parasitology, **110**: S11-S16.
31. **Buxton D., Thomson K., Maley S., Wright S., Bos H. J. (1991).** "Vaccination of sheep with a live incomplete strain (S48) of *Toxoplasma gondii* and their immunity to challenge when pregnant." The Veterinary Record, **129**: 89-93.
32. **Buzoni-Gatel D., Lepage A. C., Dimier-Poisson I. H., Bout D. T., Kasper L. H. (1997).** "Adoptive transfer of gut intraepithelial lymphocytes protects against murine infection with *Toxoplasma gondii*." Journal of Immunology, **158**: 5883-5889.
33. **Cai G., Kastelein R., Hunter C. A. (2000).** "Interleukin-18 (IL-18) enhances innate IL-12-mediated resistance to *Toxoplasma gondii*." Infection and Immunity, **68**: 6932-6938.
34. **Candolfi E., Hunter C. A., Remington J. S. (1994).** "Mitogen and antigen specific proliferation of T cells in murine toxoplasmosis is inhibited by reactive nitrogen intermediates." Infection and Immunity, **62**: 1995-2001.
35. **Candolfi E., Robert R., Villard O., Letscher-Bru V., Antoni E., Kien T. (1997).** SAG1 vaccination in association with IL-12 as an adjuvant enhances resistance of pregnant mice to toxoplasmosis but facilitate transplacental passage of the parasite to the fetus. *Immunity in Early Life*. Annecy, 17-19 novembre.
36. **Canessa A., Del Bono V., Miletich F., Pistoia V. (1992).** "Serum cytokines in toxoplasmosis: increased levels of interferon-gamma in immunocompetent patients with lymphadenopathy but not in AIDS patients with encephalitis." The Journal of Infectious Diseases, **165**: 1168-1170.

37. **Canessa A., Pistoia V., Roncella S., Merli A., Melioli G., Terragna A., Ferrarini M. (1988).** "An in vitro model for *Toxoplasma* infection in man. Interaction between CD4+ monoclonal T cells and macrophages results in killing of trophozoites." Journal of Immunology, **140**: 3580-3588.
38. **Carey K. L., Jongco A. M., Kim K., Ward G. E. (2004).** "The *Toxoplasma gondii* Rhopty Protein ROP4 Is Secreted into the Parasitophorous Vacuole and Becomes Phosphorylated in Infected Cells." Eukaryotic Cell, **3**: 1320-1330.
39. **Carruthers V. B. (2002).** "Host cell invasion by the opportunistic pathogen *Toxoplasma gondii*." Acta Tropica, **81**: 111-122.
40. **Carruthers V. B., Giddings O. K., Sibley L. D. (1999).** "Secretion of micronemal proteins is associated with toxoplasma invasion of host cells." Cellular Microbiology, **1**: 225-235.
41. **Casadevall A. (1998).** "Antibody-mediated protection against intracellular pathogens." Trends in Microbiology, **6**: 102-107.
42. **Casadevall A., Pirofski L. A. (2004).** "New concepts in antibody-mediated immunity." Infection and Immunity, **72**: 6191-6196.
43. **Casciotti L., Ely K. H., Williams M. E., Khan I. A. (2002).** "CD8(+)-T-cell immunity against *Toxoplasma gondii* can be induced but not maintained in mice lacking conventional CD4(+) T cells." Infection and Immunity, **70**: 434-443.
44. **Cha D. Y., Song I. K., Lee G. S., Hwang O. S., Noh H. J., Yeo S. D., Shin D. W., Lee Y. H. (2001).** "Effects of specific monoclonal antibodies to dense granular proteins on the invasion of *Toxoplasma gondii* in vitro and in vivo." The Korean Journal of Parasitology, **39**: 233-240.
45. **Chang H. R., Grau G. E., Pechere J. C. (1990).** "Role of TNF and IL-1 in infections with *Toxoplasma gondii*." Immunology, **69**: 33-37.
46. **Chao C. C., Hu S., Gekker G., Novick W. J., Jr., Remington J. S., Peterson P. K. (1993).** "Effects of cytokines on multiplication of *Toxoplasma gondii* in microglial cells." Journal of Immunology, **150**: 3404-3410.
47. **Chaouat G., Assal Meliani A., Martal J., Raghupathy R., Elliot J., Mosmann T., Wegmann T. G. (1995).** "IL-10 prevents naturally occurring fetal loss in the CBA x DBA/2 mating combination, and local defect in IL-10 production in this abortion-prone combination is corrected by in vivo injection of IFN-tau." Journal of Immunology, **154**: 4261-4268.
48. **Chardes T., Buzoni-Gatel D., Lepage A., Bernard F., Bout D. (1994).** "*Toxoplasma gondii* oral infection induces specific cytotoxic CD8 alpha/beta+ Thy-1+ gut intraepithelial lymphocytes, lytic for parasite-infected enterocytes." Journal of Immunology, **153**: 4596-4603.

49. **Chen G., Chen H., Guo H., Zheng H. (2002).** "Protective effect of DNA-mediated immunization with a combination of SAG1 and IL-2 gene adjuvant against infection of *Toxoplasma gondii* in mice." Chinese medical Journal, **115**: 1448-1452.
50. **Chen M., Mun H. S., Piao L. X., Aosai F., Norose K., Mohamed R. M., Belal U. S., Fang H., Ahmed A. K., Kang H. K., Matsuzaki G., Kitamura D., Yano A. (2003).** "Induction of protective immunity by primed B-1 cells in *Toxoplasma gondii* -infected B cell-deficient mice." Microbiology and Immunology, **47**: 997-1003.
51. **Collazo C. M., Yap G. S., Sempowski G. D., Lusby K. C., Tessarollo L., Woude G. F., Sher A., Taylor G. A. (2001).** "Inactivation of LRG-47 and IRG-47 reveals a family of interferon gamma-inducible genes with essential, pathogen-specific roles in resistance to infection." The Journal of Experimental Medicine, **194**: 181-188.
52. **Costa J. M., Pautas C., Ernault P., Foulet F., Cordonnier C., Bretagne S. (2000).** "Real-time PCR for diagnosis and follow-up of *Toxoplasma* reactivation after allogeneic stem cell transplantation using fluorescence resonance energy transfer hybridization probes." Journal of Clinical Microbiology, **38**: 2929-2932.
53. **Couper K. N., Nielsen H. V., Petersen E., Roberts F., Roberts C. W., Alexander J. (2003).** "DNA vaccination with the immunodominant tachyzoite surface antigen (SAG-1) protects against adult acquired *Toxoplasma gondii* infection but does not prevent maternofetal transmission." Vaccine, **21**: 2813-2820.
54. **Dang Y., Beckers J., Wang C. R., Heyborne K. D. (2000).** "Natural killer 1.1(+) alpha beta T cells in the periimplantation uterus." Immunology, **101**: 484-491.
55. **Darcy F., Maes P., Gras-Masse H., Auriault C., Bossus M., Deslee D., Godard I., Cesbron M. F., Tartar A., Capron A. (1992).** "Protection of mice and nude rats against toxoplasmosis by a multiple antigenic peptide construction derived from *Toxoplasma gondii* P30 antigen." Journal of Immunology, **149**: 3636-3641.
56. **Daubener W., Mackenzie C., Hadding U. (1995).** "Establishment of T-helper type 1- and T-helper type 2-like human *Toxoplasma* antigen-specific T-cell clones." Immunology, **86**: 79-84.
57. **Debard N., Buzoni-Gatel D., Bout D. (1996).** "Intranasal immunization with SAG1 protein of *Toxoplasma gondii* in association with cholera toxin dramatically reduces development of cerebral cysts after oral infection." Infection and Immunity, **64**: 2158-2166.
58. **Denkers E. Y. (1999).** "T lymphocyte-dependent effector mechanisms of immunity to *Toxoplasma gondii*." Microbes and Infection, **1**: 699-708.
59. **Denkers E. Y., Butcher B. A., Del Rio L., Bennouna S. (2004).** "Neutrophils, dendritic cells and *Toxoplasma*." International Journal for Parasitology, **34**: 411-421.
60. **Denkers E. Y., Gazzinelli R. T. (1998).** "Regulation and function of T-cell-mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection." Clinical Microbiology Reviews, **11**: 569-588.

61. **Denkers E. Y., Gazzinelli R. T., Martin D., Sher A. (1993).** "Emergence of NK1.1+ cells as effectors of IFN-gamma dependent immunity to *Toxoplasma gondii* in MHC class I-deficient mice." The Journal of Experimental Medicine, **178**: 1465-1472.
62. **Denkers E. Y., Sher A. (1997).** "Role of natural killer and NK1+ T-cells in regulating cell-mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection." Biochemical Society Transactions, **25**: 699-703.
63. **Desmonts G., Couvreur J. (1974).** "Toxoplasmosis in pregnancy and its transmission to the fetus." Bulletin of the New York Academy of Medicine, **50**: 146-159.
64. **Doolan D. L., Hoffman S. L. (1999).** "IL-12 and NK cells are required for antigen-specific adaptive immunity against malaria initiated by CD8+ T cells in the *Plasmodium yoelii* model." Journal of Immunology, **163**: 884-892.
65. **Dubey J. P. (1997).** "Bradyzoite-induced murine toxoplasmosis: stage conversion, pathogenesis, and tissue cyst formation in mice fed bradyzoites of different strains of *Toxoplasma gondii*." The Journal of Eukaryotic Microbiology, **44**: 592-602.
66. **Dubey J. P., Speer C. A., Shen S. K., Kwok O. C., Blixt J. A. (1997).** "Oocyst-induced murine toxoplasmosis: life cycle, pathogenicity, and stage conversion in mice fed *Toxoplasma gondii* oocysts." The Journal of Parasitology, **83**: 870-882.
67. **Dunn D., Wallon M., Peyron F., Petersen E., Peckham C., Gilbert R. (1999).** "Mother-to-child transmission of toxoplasmosis: risk estimates for clinical counselling." Lancet, **353**: 1829-1833.
68. **Edelson B. T., Cossart P., Unanue E. R. (1999).** "Cutting edge: paradigm revisited: antibody provides resistance to *Listeria* infection." Journal of Immunology, **163**: 4087-4090.
69. **Edelson B. T., Unanue E. R. (2001).** "Intracellular antibody neutralizes *Listeria* growth." Immunity, **14**: 503-512.
70. **Eichenwald H. (1948).** "Experimental toxoplasmosis. Transmission of the infection in utero and through the milk of lactating female mice." American Journal of Diseases of Children, **76**: 307-315.
71. **Elsaid M. M., Martins M. S., Frezard F., Braga E. M., Vitor R. W. (2001).** "Vertical toxoplasmosis in a murine model. Protection after immunization with antigens of *Toxoplasma gondii* incorporated into liposomes." Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, **96**: 99-104.
72. **Elsaid M. M., Vitor R. W., Frezard F. J., Martins M. S. (1999).** "Protection against toxoplasmosis in mice immunized with different antigens of *Toxoplasma gondii* incorporated into liposomes." Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, **94**: 485-490.

73. Ely K. H., Kasper L. H., Khan I. A. (1999). "Augmentation of the CD8+ T cell response by IFN-gamma in IL-12-deficient mice during *Toxoplasma gondii* infection." Journal of Immunology, **162**: 5449-5454.
74. Erbe D. V., Pfefferkorn E. R., Fanger M. W. (1991). "Functions of the various IgG Fc receptors in mediating killing of *Toxoplasma gondii*." Journal of Immunology, **146**: 3145-3151.
75. Escajadillo A., Frenkel J. K. (1991). "Experimental toxoplasmosis and vaccine tests in *Aotus* monkeys." The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, **44**: 382-389.
76. Fadul C. E., Channon J. Y., Kasper L. H. (1995). "Survival of immunoglobulin G-opsonized *Toxoplasma gondii* in nonadherent human monocytes." Infection and Immunity, **63**: 4290-4294.
77. Fatoohi A. F., Cozon G. J., Greenland T., Ferrandiz J., Bienvenu J., Picot S., Peyron F. (2002). "Cellular immune responses to recombinant antigens in pregnant women chronically infected with *Toxoplasma gondii*." Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, **9**: 704-707.
78. Ferreira M. U., Kimura E. A., Katzin A. M., Santos-Neto L. L., Ferrari J. O., Villalobos J. M., de Carvalho M. E. (1998). "The IgG-subclass distribution of naturally acquired antibodies to *Plasmodium falciparum*, in relation to malaria exposure and severity." Annals of Tropical Medicine and Parasitology, **92**: 245-256.
79. Ferro E. A., Silva D. A., Bevilacqua E., Mineo J. R. (2002). "Effect of *Toxoplasma gondii* infection kinetics on trophoblast cell population in *Calomys callosus*, a model of congenital toxoplasmosis." Infection and Immunity, **70**: 7089-7094.
80. Foster B. G., McCulloch W. F. (1968). "Studies of active and passive immunity in animals inoculated with *Toxoplasma gondii*." Canadian Journal of Microbiology, **14**: 103-110.
81. Frenkel J. K., Pfefferkorn E. R., Smith D. D., Fishback J. L. (1991). "Prospective vaccine prepared from a new mutant of *Toxoplasma gondii* for use in cats." American Journal of Veterinary Research, **52**: 759-763.
82. Freyre A., Choromanski L., Fishback J. L., Popiel I. (1993). "Immunization of cats with tissue cysts, bradyzoites, and tachyzoites of the T-263 strain of *Toxoplasma gondii*." The Journal of Parasitology, **79**: 716-719.
83. Friedland J. S., Shattock R. J., Johnson J. D., Remick D. G., Holliman R. E., Griffin G. E. (1993). "Differential cytokine gene expression and secretion after phagocytosis by a human monocytic cell line of *Toxoplasma gondii* compared with *Mycobacterium tuberculosis*." Clinical and Experimental Immunology, **91**: 282-286.
84. Gavrilescu L. C., Denkers E. Y. (2001). "IFN-gamma overproduction and high level apoptosis are associated with high but not low virulence *Toxoplasma gondii* infection." Journal of Immunology, **167**: 902-909.

85. **Gazzinelli R., Xu Y., Hieny S., Cheever A., Sher A. (1992).** "Simultaneous depletion of CD4+ and CD8+ T lymphocytes is required to reactivate chronic infection with *Toxoplasma gondii*." Journal of Immunology, **149**: 175-180.
86. **Gazzinelli R. T., Bala S., Stevens R., Baseler M., Wahl L., Kovacs J., Sher A. (1995).** "HIV infection suppresses type 1 lymphokine and IL-12 responses to *Toxoplasma gondii* but fails to inhibit the synthesis of other parasite-induced monokines." Journal of Immunology, **155**: 1565-1574.
87. **Gazzinelli R. T., Denkers E. Y., Sher A. (1993).** "Host resistance to *Toxoplasma gondii*: model for studying the selective induction of cell-mediated immunity by intracellular parasites." Infectious Agents and Disease, **2**: 139-149.
88. **Gazzinelli R. T., Eltoum I., Wynn T. A., Sher A. (1993).** "Acute cerebral toxoplasmosis is induced by *in vivo* neutralization of TNF-alpha and correlates with the down-regulated expression of inducible nitric oxide synthase and other markers of macrophage activation." Journal of Immunology, **151**: 3672-3681.
89. **Gazzinelli R. T., Hakim F. T., Hieny S., Shearer G. M., Sher A. (1991).** "Synergistic role of CD4+ and CD8+ T lymphocytes in IFN-gamma production and protective immunity induced by an attenuated *Toxoplasma gondii* vaccine." Journal of Immunology, **146**: 286-292.
90. **Gazzinelli R. T., Hieny S., Wynn T., Wolf S., Sher A. (1993).** "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." Proceedings of National Academy of Sciences of USA, **146**: 286-292.
91. **Gazzinelli R. T., Oswald I. P., James S. L., Sher A. (1992).** "IL-10 inhibits parasite killing and nitrogen oxide production by IFN- gamma-activated macrophages." Journal of Immunology, **148**: 1792-1796.
92. **Gazzinelli R. T., Wysocka M., Hieny S., Scharton-Kersten T., Cheever A., Kuhn R., Muller W., Trinchieri G., Sher A. (1996).** "In the absence of endogenous IL-10, mice acutely infected with *Toxoplasma gondii* succumb to a lethal immune response dependent on CD4+ T cells and accompanied by overproduction of IL-12, IFN-gamma and TNF- alpha." Journal of Immunology, **157**: 798-805.
93. **Giordano L. F., Lasmar E. P., Tavora E. R., Lasmar M. F. (2002).** "Toxoplasmosis transmitted via kidney allograft: case report and review." Transplantation Proceedings, **34**: 498-499.
94. **Griffiths G. M. (1995).** "The cell biology of CTL killing." Current Opinion in Immunology, **7**: 343-348.
95. **Grimwood J., Smith J. E. (1996).** "*Toxoplasma gondii*: the role of parasite surface and secreted proteins in host cell invasion." International Journal for Parasitology, **26**: 169-173.

96. **Guilbert L., Robertson S. A., Wegmann T. G. (1993).** "The trophoblast as an integral component of a macrophage-cytokine network." Immunology and Cell Biology, **71** (Pt 1): 49-57.
97. **Hakim F. T., Gazzinelli R. T., Denkers E., Hieny S., Shearer G. M., Sher A. (1991).** "CD8+ T cells from mice vaccinated against *Toxoplasma gondii* are cytotoxic for parasite-infected or antigen-pulsed host cells." Journal of Immunology, **147**: 2310-2316.
98. **Haumont M., Delhaye L., Garcia L., Jurado M., Mazzu P., Daminet V., Verlant V., Bollen A., Biemans R., Jacquet A. (2000).** "Protective immunity against congenital toxoplasmosis with recombinant SAG1 protein in a guinea pig model." Infection and Immunity, **68**: 4948-4953.
99. **Hauser W. E., Jr., Remington J. S. (1981).** "Effect of monoclonal antibodies on phagocytosis and killing of *Toxoplasma gondii* by normal macrophages." Infection and Immunity, **32**: 637-640.
100. **He X. L., Grigg M. E., Boothroyd J. C., Garcia K. C. (2002).** "Structure of the immunodominant surface antigen from the *Toxoplasma gondii* SRS superfamily." Nature Structural Biology, **9**: 606-611.
101. **Ho Yen D. O., Joss A. W. L. (1992).** Human toxoplasmosis. Oxford, Oxford Medical Publication.
102. **Huddleston H., Schust D. J. (2004).** "Immune interactions at the maternal-fetal interface: a focus on antigen presentation." American Journal of Reproductive Immunology, **51**: 283-289.
103. **Hunter C. A., Bermudez L., Beernink H., Waegell W., Remington J. S. (1995).** "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*." European Journal of Immunology, **25**: 994-1000.
104. **Hunter C. A., Suzuki Y., Subauste C. S., Remington J. S. (1996).** "Cells and cytokines in resistance to *Toxoplasma gondii*." Current Topics in Microbiology and Immunology, **219**: 113-125.
105. **Huong P. L., Kolk A. H., Eggelte T. A., Verstijnen C. P., Gilis H., Hendriks J. T. (1991).** "Measurement of antigen specific lymphocyte proliferation using 5-bromo-deoxyuridine incorporation. An easy and low cost alternative to radioactive thymidine incorporation." Journal of Immunological Methods, **140**: 243-248.
106. **Igietseme J. U., Eko F. O., He Q., Black C. M. (2004).** "Antibody regulation of Tcell immunity: implications for vaccine strategies against intracellular pathogens." Expert Review of Vaccines, **3**: 23-34.

107. **Ismael A. B., Sekkai D., Collin C., Bout D., Mevelec M. N. (2003).** "The MIC3 gene of *Toxoplasma gondii* is a novel potent vaccine candidate against toxoplasmosis." Infection and Immunity, **71**: 6222-6228.
108. **Iwasaki A., Kelsall B. L. (1999).** "Freshly isolated Peyer's patch, but not spleen, dendritic cells produce interleukin 10 and induce the differentiation of T helper type 2 cells." The Journal of Experimental Medicine, **190**: 229-239.
109. **Jacobs D., Vercammen M., Saman E. (1999).** "Evaluation of recombinant dense granule antigen 7 (GRA7) of *Toxoplasma gondii* for detection of immunoglobulin G antibodies and analysis of a major antigenic domain." Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, **6**: 24-29.
110. **Jacquet A., Coulon L., De Neve J., Daminet V., Haumont M., Garcia L., Bollen A., Jurado M., Biemans R. (2001).** "The surface antigen SAG3 mediates the attachment of *Toxoplasma gondii* to cell-surface proteoglycans." Molecular and Biochemical Parasitology, **116**: 35-44.
111. **Johnson A. M., McDonald P. J., Neoh S. H. (1983).** "Monoclonal antibodies to *Toxoplasma* cell membrane surface antigens protect mice from toxoplasmosis." The Journal of Protozoology, **30**: 351-356.
112. **Johnson L. L., Sayles P. C. (2002).** "Deficient humoral responses underlie susceptibility to *Toxoplasma gondii* in CD4-deficient mice." Infection and Immunity, **70**: 185-191.
113. **Joiner K. A., Fuhrman S. A., Miettinen H. M., Kasper L. H., Mellman I. (1990).** "*Toxoplasma gondii*: fusion competence of parasitophorous vacuoles in Fc receptor-transfected fibroblasts." Science, **249**: 641-646.
114. **Joiner K. A., Roos D. S. (2002).** "Secretory traffic in the eukaryotic parasite *Toxoplasma gondii*: less is more." The Journal of Cell Biology, **157**: 557-563.
115. **Jones T. C., Bienz K. A., Erb P. (1986).** "*In vitro* cultivation of *Toxoplasma gondii* cysts in astrocytes in the presence of gamma interferon." Infection and Immunity, **51**: 147-156.
116. **Jung C., Lee C. Y., Grigg M. E. (2004).** "The SRS superfamily of *Toxoplasma* surface proteins." International Journal for Parasitology, **34**: 285-296.
117. **Kang H., Remington J. S., Suzuki Y. (2000).** "Decreased resistance of B cell-deficient mice to infection with *Toxoplasma gondii* despite unimpaired expression of IFN-gamma, TNF- alpha, and inducible nitric oxide synthase." Journal of Immunology, **164**: 2629-2634.
118. **Kasper L., Courret N., Darche S., Luangsay S., Mennechet F., Minns L., Rachinel N., Ronet C., Buzoni-Gatel D. (2004).** "*Toxoplasma gondii* and mucosal immunity." International Journal for Parasitology, **34**: 401-409.

119. **Kasper L. H., Crabb J. H., Pfefferkorn E. R. (1983).** "Purification of a major membrane protein of *Toxoplasma gondii* by immunoabsorption with a monoclonal antibody." Journal of Immunology, **130**: 2407-2412.
120. **Kasper L. H., Currie K. M., Bradley M. S. (1985).** "An unexpected response to vaccination with a purified major membrane tachyzoite antigen (P30) of *Toxoplasma gondii*." Journal of Immunology, **134**: 3426-3431.
121. **Kasper L. H., Khan I. A. (1993).** "Role of P30 in host immunity and pathogenesis of *T. gondii* infection." Research in Immunology, **144**: 45-48.
122. **Kasper L. H., Khan I. A., Ely K. H., Buelow R., Boothroyd J. C. (1992).** "Antigen-specific (p30) mouse CD8⁺ T cells are cytotoxic against *Toxoplasma gondii*-infected peritoneal macrophages." Journal of Immunology, **148**: 1493-1498.
123. **Keeley A., Soldati D. (2004).** "The glideosome: a molecular machine powering motility and host-cell invasion by Apicomplexa." Trends in Cell Biology, **14**: 528-532.
124. **Khan I. A., Eckel M. E., Pfefferkorn E. R., Kasper L. H. (1988).** "Production of gamma interferon by cultured human lymphocytes stimulated with a purified membrane protein (P30) from *Toxoplasma gondii*." The Journal of Infectious Diseases, **157**: 979-984.
125. **Khan I. A., Ely K. H., Kasper L. H. (1991).** "A purified parasite antigen (p30) mediates CD8⁺ T cell immunity against fatal *Toxoplasma gondii* infection in mice." Journal of Immunology, **147**: 3501-3506.
126. **Khan I. A., Ely K. H., Kasper L. H. (1994).** "Antigen-specific CD8⁺ T cell clone protects against acute *Toxoplasma gondii* infection in mice." Journal of Immunology, **152**: 1856-1860.
127. **Khan I. A., Matsuura T., Kasper L. H. (1994).** "Interleukin-12 enhances murine survival against acute toxoplasmosis." Infection and Immunity, **62**: 1639-1642.
128. **Khan I. A., Smith K. A., Kasper L. H. (1988).** "Induction of antigen-specific parasitocidal cytotoxic T cell splenocytes by a major membrane protein (P30) of *Toxoplasma gondii*." Journal of Immunology, **141**: 3600-3605.
129. **Khan I. A., Smith K. A., Kasper L. H. (1990).** "Induction of antigen-specific human cytotoxic T cells by *Toxoplasma gondii*." The Journal of Clinical Investigation, **85**: 1879-1886.
130. **Kim S. K., Reed D. S., Heath W. R., Carbone F., Lefrancois L. (1997).** "Activation and migration of CD8 T cells in the intestinal mucosa." Journal of Immunology, **159**: 4295-4306.
131. **King A., Balendran N., Wooding P., Carter N. P., Loke Y. W. (1991).** "CD3-leukocytes present in the human uterus during early placentation: phenotypic and morphologic characterization of the CD56⁺⁺ population." Developmental Immunology, **1**: 169-190.

132. **Krahenbuhl J. L., Ruskin J., Remington J. S. (1972).** "The use of killed vaccines in immunization against an intracellular parasite: *Toxoplasma gondii*." Journal of Immunology, **108**: 425-431.
133. **Langermans J. A., Nibbering P. H., Van Vuren-Van Der Hulst M. E., Van Furth R. (2001).** "Transforming growth factor-beta suppresses interferon-gamma-induced toxoplasmastatic activity in murine macrophages by inhibition of tumour necrosis factor-alpha production." Parasite Immunology, **23**: 169-175.
134. **Langermans J. A., Van der Hulst M. E., Nibbering P. H., Hiemstra P. S., Fransen L., Van Furth R. (1992).** "IFN-gamma-induced L-arginine-dependent toxoplasmastatic activity in murine peritoneal macrophages is mediated by endogenous tumor necrosis factor-alpha." Journal of Immunology, **148**: 568-574.
135. **Lee B. Y., Ahn M. H., Kim H. C., Min D. Y. (2001).** "*Toxoplasma gondii*: ultrastructural localization of specific antigens and inhibition of intracellular multiplication by monoclonal antibodies." The Korean Journal of Parasitology, **39**: 67-75.
136. **Lekutis C., Ferguson D. J., Grigg M. E., Camps M., Boothroyd J. C. (2001).** "Surface antigens of *Toxoplasma gondii*: variations on a theme." International Journal for Parasitology, **31**: 1285-1292.
137. **Lepage A. C., Buzoni-Gatel D., Bout D. T., Kasper L. H. (1998).** "Gut-derived intraepithelial lymphocytes induce long term immunity against *Toxoplasma gondii*." Journal of Immunology, **161**: 4902-4908.
138. **Leriche M. A., Dubremetz J. F. (1990).** "Exocytosis of *Toxoplasma gondii* dense granules into the parasitophorous vacuole after host cell invasion." Parasitology Research, **76**: 559-562.
139. **Letscher-Bru V., Pfaff A. W., Abou-Bacar A., Filisetti D., Antoni E., Villard O., Klein J. P., Candolfi E. (2003).** "Vaccination with *Toxoplasma gondii* SAG-1 protein is protective against congenital toxoplasmosis in BALB/c mice but not in CBA/J mice." Infection and Immunity, **71**: 6615-6619.
140. **Letscher-Bru V., Villard O., Risse B., Zauke M., Klein J. P., Kien T. T. (1998).** "Protective effect of vaccination with a combination of recombinant surface antigen 1 and interleukin-12 against toxoplasmosis in mice." Infection and Immunity, **66**: 4503-4506.
141. **Leyva R., Herion P., Saavedra R. (2001).** "Genetic immunization with plasmid DNA coding for the ROP2 protein of *Toxoplasma gondii*." Parasitology Research, **87**: 70-79.
142. **Lidstrom C., Matthiesen L., Berg G., Sharma S., Ernerudh J., Ekerfelt C. (2003).** "Cytokine secretion patterns of NK cells and macrophages in early human pregnancy decidua and blood: implications for suppressor macrophages in *decidua*." American Journal of Reproductive Immunology, **50**: 444-452.

143. **Lin H., Mosmann T. R., Guilbert L., Tuntipopipat S., Wegmann T. G. (1993).** "Synthesis of T helper 2-type cytokines at the maternal-fetal interface." Journal of Immunology, **151**: 4562-4573.
144. **Long M. T., Baszler T. V. (2000).** "Neutralization of maternal IL-4 modulates congenital protozoal transmission: comparison of innate versus acquired immune responses." Journal of Immunology, **164**: 4768-4774.
145. **Luft B. J., Remington J. S. (1982).** "Effect of pregnancy on resistance to *Listeria monocytogenes* and *Toxoplasma gondii* infections in mice." Infection and Immunity, **38**: 1164-1171.
146. **MacKenzie C. R., Gonzalez R. G., Kniep E., Roch S., Daubener W. (1999).** "Cytokine mediated regulation of interferon-gamma-induced IDO activation." Advance in Experimental Medicine and Biology, **467**: 533-539.
147. **Makioka A., Kobayashi A. (1991).** "Toxoplasma-cidal activity of macrophages activated by recombinant major surface antigen (P30) of *Toxoplasma gondii*." Infection and Immunity, **59**: 2851-2852.
148. **Martin V., Supanitsky A., Echeverria P. C., Litwin S., Tanos T., De Roodt A. R., Guarnera E. A., Angel S. O. (2004).** "Recombinant GRA4 or ROP2 protein combined with alum or the gra4 gene provides partial protection in chronic murine models of toxoplasmosis." Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, **11**: 704-710.
149. **Maubert B., Guilbert L. J., Deloron P. (1997).** "Cytoadherence of *Plasmodium falciparum* to intercellular adhesion molecule 1 and chondroitin-4-sulfate expressed by the syncytiotrophoblast in the human placenta." Infection and Immunity, **65**: 1251-1257.
150. **McCabe R. E., Luft B. J., Remington J. S. (1984).** "Effect of murine interferon gamma on murine toxoplasmosis." The Journal of Infectious Diseases, **150**: 961-962.
151. **McLeod R., Frenkel J. K., Estes R. G., Mack D. G., Eisenhauer P. B., Gibori G. (1988).** "Subcutaneous and intestinal vaccination with tachyzoites of *Toxoplasma gondii* and acquisition of immunity to peroral and congenital toxoplasma challenge." Journal of Immunology, **140**: 1632-1637.
152. **Mele A., Paterson P. J., Prentice H. G., Leoni P., Kibbler C. C. (2002).** "Toxoplasmosis in bone marrow transplantation: a report of two cases and systematic review of the literature." Bone Marrow Transplantation, **29**: 691-698.
153. **Mennechet F. J., Kasper L. H., Rachinel N., Minns L. A., Luangsay S., Vandewalle A., Buzoni-Gatel D. (2004).** "Intestinal intraepithelial lymphocytes prevent pathogen-driven inflammation and regulate the Smad/T-bet pathway of lamina propria CD4+ T cells." European Journal of Immunology, **34**: 1059-1067.

154. Mineo J. R., Kasper L. H. (1994). "Attachment of *Toxoplasma gondii* to host cells involves major surface protein, SAG-1 (P30)." Experimental Parasitology, **79**: 11-20.
155. Mineo J. R., McLeod R., Mack D., Smith J., Khan I. A., Ely K. H., Kasper L. H. (1993). "Antibodies to *Toxoplasma gondii* major surface protein (SAG-1, P30) inhibit infection of host cells and are produced in murine intestine after peroral infection." Journal of Immunology, **150**: 3951-3964.
156. Mishima M., Xuan X., Shioda A., Omata Y., Fujisaki K., Nagasawa H., Mikami T. (2001). "Modified protection against *Toxoplasma gondii* lethal infection and brain cyst formation by vaccination with SAG2 and SRS1." The Journal of Veterinary Medical Science, **63**: 433-438.
157. Moffett-King A. (2002). "Natural killer cells and pregnancy." Nature reviews. Immunology, **2**: 656-663.
158. Monographie Fludara, 2002. www.berlex.ca/docs/F10208FP.pdf.
159. Montoya J. G., Liesenfeld O. (2004). "Toxoplasmosis." Lancet, **363**: 1965-1976.
160. Montoya J. G., Lowe K. E., Clayberger C., Moody D., Do D., Remington J. S., Talib S., Subauste C. S. (1996). "Human CD4+ and CD8+ T lymphocytes are both cytotoxic to *Toxoplasma gondii*-infected cells." Infection and Immunity, **64**: 176-181.
161. Moore T., Ekworomadu C. O., Eko F. O., MacMillan L., Ramey K., Ananaba G. A., Patrickson J. W., Nagappan P. R., Lyn D., Black C. M., Igietseme J. U. (2003). "Fc receptor-mediated antibody regulation of T cell immunity against intracellular pathogens." The Journal of Infectious Diseases, **188**: 617-624.
162. Mordue D. G., Monroy F., La Regina M., Dinarello C. A., Sibley L. D. (2001). "Acute toxoplasmosis leads to lethal overproduction of Th1 cytokines." Journal of Immunology, **167**: 4574-4584.
163. Moretto M., Casciotti L., Durell B., Khan I. A. (2000). "Lack of CD4(+) T cells does not affect induction of CD8(+) T-cell immunity against *Encephalitozoon cuniculi* infection." Infection and Immunity, **68**: 6223-6232.
164. Morisaki J. H., Heuser J. E., Sibley L. D. (1995). "Invasion of *Toxoplasma gondii* occurs by active penetration of the host cell." Journal of Cell Science, **108 (Pt 6)**: 2457-2464.
165. Murray H. W., Cohn Z. A. (1979). "Macrophage oxygen-dependent antimicrobial activity. I. Susceptibility of *Toxoplasma gondii* to oxygen intermediates." The Journal of Experimental Medicine, **150**: 938-949.
166. Nakano Y., Hisaeda H., Sakai T., Zhang M., Maekawa Y., Zhang T., Nishitani M., Ishikawa H., Himeno K. (2001). "Granule-dependent killing of *Toxoplasma gondii* by CD8+ T cells." Immunology, **104**: 289-298.

167. Nakao M., Konishi E. (1991). "Proliferation of *Toxoplasma gondii* in human neutrophils *in vitro*." Parasitology, **103 Pt 1**: 23-27.
168. Nakayama I. (1965). "Effects of immunization procedures in experimental toxoplasmosis." The Keio Journal of Medicine, **14**: 63-72.
169. Neudeck A., Stachelhaus S., Nischik N., Striepen B., Reichmann G., Fischer H. G. (2002). "Expression variance, biochemical and immunological properties of *Toxoplasma gondii* dense granule protein GRA7." Microbes and Infection, **4**: 581-590.
170. Ng S. C., Gilman-Sachs A., Thaker P., Beaman K. D., Beer A. E., Kwak-Kim J. (2002). "Expression of intracellular Th1 and Th2 cytokines in women with recurrent spontaneous abortion, implantation failures after IVF/ET or normal pregnancy." American Journal of Reproductive Immunology, **48**: 77-86.
171. Ngo H. M., Yang M., Joiner K. A. (2004). "Are rhoptries in Apicomplexan parasites secretory granules or secretory lysosomal granules?" Molecular Microbiology, **52**: 1531-1541.
172. Nickdel M. B., Lyons R. E., Roberts F., Brombacher F., Hunter C. A., Alexander J., Roberts C. W. (2004). "Intestinal pathology during acute toxoplasmosis is IL-4 dependent and unrelated to parasite burden." Parasite Immunology, **26**: 75-82.
173. Nicolle C., Manceaux L. (1909). "Sur un protozoaire nouveau du gondi : *Toxoplasma gondii* n.g." Archives de l'Institut Pasteur de Tunis, **1**: 97-103.
174. Nielsen H. V., Lauemoller S. L., Christiansen L., Buus S., Fomsgaard A., Petersen E. (1999). "Complete protection against lethal *Toxoplasma gondii* infection in mice immunized with a plasmid encoding the SAG1 gene." Infection and Immunity, **67**: 6358-6363.
175. Nosanchuk J. D., Steenbergen J. N., Shi L., Deepe G. S., Jr., Casadevall A. (2003). "Antibodies to a cell surface histone-like protein protect against *Histoplasma capsulatum*." The Journal of Clinical Investigation, **112**: 1164-1175.
176. Ohteki T., Fukao T., Suzue K., Maki C., Ito M., Nakamura M., Koyasu S. (1999). "Interleukin 12-dependent interferon gamma production by CD8alpha+ lymphoid dendritic cells." The Journal of Experimental Medicine, **189**: 1981-1986.
177. Paffaro V. A., Jr., Bizinotto M. C., Joazeiro P. P., Yamada A. T. (2003). "Subset classification of mouse uterine natural killer cells by DBA lectin reactivity." Placenta, **24**: 479-488.
178. Parker S. J., Roberts C. W., Alexander J. (1991). "CD8+ T cells are the major lymphocyte subpopulation involved in the protective immune response to *Toxoplasma gondii* in mice." Clinical and Experimental Immunology, **84**: 207-212.
179. Pavia C. S. (1986). "Protection against experimental toxoplasmosis by adoptive immunotherapy." Journal of Immunology, **137**: 2985-2990.

180. **Pavia C. S., Bittker S. J., Curnick K. E. (1992).** "Passive immunization protects guinea pigs from lethal *Toxoplasma* infection." FEMS Microbiology Immunology, **4**: 97-104.
181. **Pelloux H., Pernod G., Polack B., Coursange E., Ricard J., Verna J. M., Ambroise-Thomas P. (1996).** "Influence of cytokines on *Toxoplasma gondii* growth in human astrocytoma-derived cells." Parasitology Research, **82**: 598-603.
182. **Pelloux H., Ricard J., Bracchi V., Markowicz Y., Verna J. M., Ambroise-Thomas P. (1994).** "Tumor necrosis factor alpha, interleukin 1 alpha, and interleukin 6 mRNA expressed by human astrocytoma cells after infection by three different strains of *Toxoplasma gondii*." Parasitology Research, **80**: 271-276.
183. **Pelloux H., Weiss J., Simon J., Muet F., Fricker-Hidalgo H., Goullier-Fleuret A., Ambroise-Thomas P. (1996).** "A new set of primers for the detection of *Toxoplasma gondii* in amniotic fluid using polymerase chain reaction." FEMS Microbiology Letters, **138**: 11-15.
184. **Petersen E., Nielsen H. V., Christiansen L., Spenter J. (1998).** "Immunization with *E. coli* produced recombinant *T. gondii* SAG1 with alum as adjuvant protect mice against lethal infection with *Toxoplasma gondii*." Vaccine, **16**: 1283-1289.
185. **Pfefferkorn E. R., Pfefferkorn L. C. (1976).** "*Toxoplasma gondii*: isolation and preliminary characterization of temperature-sensitive mutants." Experimental Parasitology, **39**: 365-376.
186. **Pleass R. J., Woof J. M. (2001).** "Fc receptors and immunity to parasites." Trends in Parasitology, **17**: 545-551.
187. **Potasman I., Araujo F. G., Desmonts G., Remington J. S. (1986).** "Analysis of *Toxoplasma gondii* antigens recognized by human sera obtained before and after infection." The Journal of Infectious Diseases, **154**: 650-657.
188. **Purner M. B., Berens R. L., Nash P. B., van Linden A., Ross E., Kruse C., Krug E. C., Curiel T. J. (1996).** "CD4-mediated and CD8-mediated cytotoxic and proliferative immune responses to *Toxoplasma gondii* in seropositive humans." Infection and Immunity, **64**: 4330-4338.
189. **Quinn H. E., Miller C. M., Ellis J. T. (2004).** "The cell-mediated immune response to *Neospora caninum* during pregnancy in the mouse is associated with a bias towards production of interleukin-4." International Journal for Parasitology, **34**: 723-732.
190. **Rahemtulla A., Fung-Leung W. P., Schilham M. W., Kundig T. M., Sambhara S. R., Narendran A., Arabian A., Wakeham A., Paige C. J., Zinkernagel R. M. (1991).** "Normal development and function of CD8+ cells but markedly decreased helper cell activity in mice lacking CD4." Nature, **353**: 180-184.
191. **Raymond J., Poissonnier M. H., Thulliez P. H., Forestier F., Daffos F., Lebon P. (1990).** "Presence of gamma interferon in human acute and congenital toxoplasmosis." Journal of Clinical Microbiology, **28**: 1434-1437.

192. **Remington J. S., Krahenbuhl J. L., Mendenhall J. W. (1972).** "A role for activated macrophages in resistance to infection with *Toxoplasma*." Infection and Immunity, **6**: 829-834.
193. **Robben P. M., Mordue D. G., Truscott S. M., Takeda K., Akira S., Sibley L. D. (2004).** "Production of IL-12 by macrophages infected with *Toxoplasma gondii* depends on the parasite genotype." Journal of Immunology, **172**: 3686-3694.
194. **Roberts C. W., Alexander J. (1992).** "Studies on a murine model of congenital toxoplasmosis: vertical disease transmission only occurs in BALB/c mice infected for the first time during pregnancy." Parasitology, **104 Pt 1**: 19-23.
195. **Roberts C. W., Brewer J. M., Alexander J. (1994).** "Congenital toxoplasmosis in the Balb/c mouse: prevention of vertical disease transmission and fetal death by vaccination." Vaccine, **12**: 1389-1394.
196. **Roberts C. W., Ferguson D. J., Jebbari H., Satoskar A., Bluethmann H., Alexander J. (1996).** "Different roles for interleukin-4 during the course of *Toxoplasma gondii* infection." Infection and Immunity, **64**: 897-904.
197. **Robinson S. A., Smith J. E., Millner P. A. (2004).** "*Toxoplasma gondii* major surface antigen (SAG1) : *in vitro* analysis of host cell binding." Parasitology, **128**: 391-396.
198. **Rodriguez D. C., F. K., Wirth J. J. (1991).** "Binding to the specific ligand to Fc receptors on *Trypanosoma cruzi* increases the infective capacity of the parasite." Immunology, **72**: 114-120.
199. **Saito S. (2000).** "Cytokine network at the feto-maternal interface." Journal of Reproductive Immunology, **47**: 87-103.
200. **Sayles P. C., Gibson G. W., Johnson L. L. (2000).** "B cells are essential for vaccination-induced resistance to virulent *Toxoplasma gondii*." Infection and Immunity, **68**: 1026-1033.
201. **Sayles P. C., Johnson L. L. (1996).** "Intact immune defenses are required for mice to resist the ts-4 vaccine strain of *Toxoplasma gondii*." Infection and Immunity, **64**: 3088-3092.
202. **Scharton-Kersten T. M., Sher A. (1997).** "Role of natural killer cells in innate resistance to protozoan infections." Current Opinion in Immunology, **9**: 44-51.
203. **Scharton-Kersten T. M., Wynn T. A., Denkers E. Y., Bala S., Grunvald E., Hieny S., Gazzinelli R. T., Sher A. (1996).** "In the absence of endogenous IFN-gamma, mice develop unimpaired IL-12 responses to *Toxoplasma gondii* while failing to control acute infection." Journal of Immunology, **157**: 4045-4054.
204. **Scharton-Kersten T. M., Yap G., Magram J., Sher A. (1997).** "Inducible nitric oxide is essential for host control of persistent but not acute infection with the intracellular pathogen *Toxoplasma gondii*." The Journal of Experimental Medicine, **185**: 1261-1273.

205. Schmidt-Wolf G. D., Negrin R. S., Schmidt-Wolf I. G. (1997). "Activated T cells and cytokine-induced CD3+CD56+ killer cells." Annals of Hematology, **74**: 51-56.
206. Schreiber R. D., Feldman H. A. (1980). "Identification of the activator system for antibody to *Toxoplasma* as the classical complement pathway." The Journal of Infectious Diseases, **141**: 366-369.
207. Scorza T., D'Souza S., Laloup M., Dewit J., De Braekeleer J., Verschueren H., Vercammen M., Huygen K., Jongert E. (2003). "A GRA1 DNA vaccine primes cytolytic CD8(+) T cells to control acute *Toxoplasma gondii* infection." Infection and Immunity, **71**: 309-316.
208. Seng S., Makala L. H., Yokoyama M., Lim C., Choi Y. H., Suzuki N., Toyoda Y., Nagasawa H. (2004). "SAG1 is a host-targeted antigen for protection against *Toxoplasma gondii* infection." Pathobiology, **71**: 144-151.
209. Sharma S. D., Hofflin J. M., Remington J. S. (1985). "In vivo recombinant interleukin 2 administration enhances survival against a lethal challenge with *Toxoplasma gondii*." Journal of Immunology, **135**: 4160-4163.
210. Sher A., Collazzo C., Scanga C., Jankovic D., Yap G., Aliberti J. (2003). "Induction and regulation of IL-12-dependent host resistance to *Toxoplasma gondii*." Immunologic Research, **27**: 521-528.
211. Sher A., Oswald I. P., Hieny S., Gazzinelli R. T. (1993). "*Toxoplasma gondii* induces a T-independent IFN-gamma response in natural killer cells that requires both adherent accessory cells and tumor necrosis factor-alpha." Journal of Immunology, **150**: 3982-3989.
212. Shirahata T., Shimoi A., Kanda H., Goto H., Nakane A. (1994). "Importance of early gamma interferon production in *Propionibacterium acnes*-induced resistance to *Toxoplasma gondii* infection in mice." The Journal of Veterinary Medical Science, **56**: 293-297.
213. Shirahata T., Yamashita T., Ohta C., Goto H., Nakane A. (1994). "CD8+ T lymphocytes are the major cell population involved in the early gamma interferon response and resistance to acute primary *Toxoplasma gondii* infection in mice." Microbiology and Immunology, **38**: 789-796.
214. Sibley L. D., Adams L. B., Fukutomi Y., Krahenbuhl J. L. (1991). "Tumor necrosis factor-alpha triggers antitoxoplasmal activity of IFN-gamma primed macrophages." Journal of Immunology, **147**: 2340-2345.
215. Silva N. M., Rodrigues C. V., Santoro M. M., Reis L. F., Alvarez-Leite J. I., Gazzinelli R. T. (2002). "Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase, tryptophan degradation, and kynurenine formation during *in vivo* infection with *Toxoplasma gondii*: induction by endogenous gamma interferon and requirement of interferon regulatory factor 1." Infection and Immunity, **70**: 859-868.

216. **Smith L. E., Rodrigues M., Russell D. G. (1991).** "The interaction between CD8+ cytotoxic T cells and *Leishmania*-infected macrophages." The Journal of Experimental Medicine, **174**: 499-505.
217. **Subauste C. S., Koniaris A. H., Remington J. S. (1991).** "Murine CD8+ cytotoxic T lymphocytes lyse *Toxoplasma gondii*-infected cells." Journal of Immunology, **147**: 3955-3959.
218. **Subauste C. S., Remington J. S. (1991).** "Role of gamma interferon in *Toxoplasma gondii* infection." European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, **10**: 58-67.
219. **Suzuki Y., Joh K., Orellana M. A., Conley F. K., Remington J. S. (1991).** "A gene(s) within the H-2D region determines the development of toxoplasmic encephalitis in mice." Immunology, **74**: 732-739.
220. **Suzuki Y., Orellana M. A., Schreiber R. D., Remington J. S. (1988).** "Interferon-gamma: the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*." Science, **240**: 516-518.
221. **Suzuki Y., Remington J. S. (1988).** "Dual regulation of resistance against *Toxoplasma gondii* infection by Lyt-2+ and Lyt-1+, L3T4+ T cells in mice." Journal of Immunology, **140**: 3943-3946.
222. **Suzuki Y., Remington J. S. (1990).** "The effect of anti-IFN-gamma antibody on the protective effect of Lyt-2+ immune T cells against toxoplasmosis in mice." Journal of Immunology, **144**: 1954-1956.
223. **Suzuki Y., Sher A., Yap G., Park D., Neyer L. E., Liesenfeld O., Fort M., Kang H., Gufwoli E. (2000).** "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*." Journal of Immunology, **164**: 5375-5382.
224. **Sydora B. C., Jamieson B. D., Ahmed R., Kronenberg M. (1996).** "Intestinal intraepithelial lymphocytes respond to systemic lymphocytic choriomeningitis virus infection." Cellular Immunology, **167**: 161-169.
225. **Tangri S., Raghupathy R. (1993).** "Expression of cytokines in placentas of mice undergoing immunologically mediated spontaneous fetal resorptions." Biology of Reproduction, **49**: 850-856.
226. **Teitelbaum R., Glatman-Freedman A., Chen B., Robbins J. B., Unanue E., Casadevall A., Bloom B. R. (1998).** "A mAb recognizing a surface antigen of *Mycobacterium tuberculosis* enhances host survival." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, **95**: 15688-15693.
227. **Thouvenin M., Candolfi E., Villard O., Klein J. P., Kien T. (1997).** "Immune response in a murine model of congenital toxoplasmosis: increased susceptibility of

- pregnant mice and transplacental passage of *Toxoplasma gondii* are type 2-dependent." Parassitologia, **39**: 279-283.
228. **Trundley A., Moffett A. (2004).** "Human uterine leukocytes and pregnancy." Tissue Antigens, **63**: 1-12.
 229. **Velge-Roussel F., Dimier-Poisson I., Buzoni-Gatel D., Bout D. (2001).** "Anti-SAG1 peptide antibodies inhibit the penetration of *Toxoplasma gondii* tachyzoites into enterocyte cell lines." Parasitology, **123**: 225-233.
 230. **Velge-Roussel F., Moretto M., Buzoni-Gatel D., Dimier-Poisson I., Ferrer M., Hoebeke J., Bout D. (1997).** "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 Immunology, **34**: 1045-1053.
 231. **Vercammen M., el Bouhdidi A., Ben Messaoud A., de Meuter F., Bazin H., Dubremetz J. F., Carlier Y. (1998).** "Identification and characterization of a Fc receptor activity on the *Toxoplasma gondii* tachyzoite." Parasite Immunology, **20**: 37-47.
 232. **Vercammen M., Scorza T., El Bouhdidi A., Van Beeck K., Carlier Y., Dubremetz J. F., Verschueren H. (1999).** "Opsonization of *Toxoplasma gondii* tachyzoites with nonspecific immunoglobulins promotes their phagocytosis by macrophages and inhibits their proliferation in nonphagocytic cells in tissue culture." Parasite Immunology, **21**: 555-563.
 233. **Vercammen M., Scorza T., Huygen K., De Braekeleer J., Diet R., Jacobs D., Saman E., Verschueren H. (2000).** "DNA vaccination with genes encoding *Toxoplasma gondii* antigens GRA1, GRA7, and ROP2 induces partially protective immunity against lethal challenge in mice." Infection and Immunity, **68**: 38-45.
 234. **Vigano P., Gaffuri B., Somigliana E., Infantino M., Vignali M., Di Blasio A. M. (2001).** "Interleukin-10 is produced by human uterine natural killer cells but does not affect their production of interferon-gamma." Molecular Human Reproduction, **7**: 971-977.
 235. **Villard O., Candolfi E., Despringre J. L., Derouin F., Marcellin L., Viville S., Kien T. (1995).** "Protective effect of low doses of an anti-IL-4 monoclonal antibody in a murine model of acute toxoplasmosis." Parasite Immunology, **17**: 233-236.
 236. **Wegmann T. G., Lin H., Guilbert L., Mosmann T. R. (1993).** "Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon?" Immunology Today, **14**: 353-356.
 237. **Williams D. M., Grumet F. C., Remington J. S. (1978).** "Genetic control of murine resistance to *Toxoplasma gondii*." Infection and Immunity, **19**: 416-420.
 238. **Wilson C. B., Remington J. S. (1979).** "Activity of human blood leukocytes against *Toxoplasma gondii*." The Journal of Infectious Diseases, **140**: 890-895.

239. **Wilson C. B., Tsai V., Remington J. S. (1980).** "Failure to trigger the oxidative metabolic burst by normal macrophages: possible mechanism for survival of intracellular pathogens." The Journal of Experimental Medicine, **151**: 328-346.
240. **Windeck T., Gross U. (1996).** "*Toxoplasma gondii* strain-specific transcript levels of SAG1 and their association with virulence." Parasitology Research, **82**: 715-719.
241. **Yamamoto J. H., Vallochi A. L., Silveira C., Filho J. K., Nussenblatt R. B., Cunha-Neto E., Gazzinelli R. T., Belfort R., Jr., Rizzo L. V. (2000).** "Discrimination between patients with acquired toxoplasmosis and congenital toxoplasmosis on the basis of the immune response to parasite antigens." The Journal of Infectious Diseases, **181**: 2018-2022.
242. **Yamashita K., Yui K., Ueda M., Yano A. (1998).** "Cytotoxic T-lymphocyte-mediated lysis of *Toxoplasma gondii*-infected target cells does not lead to death of intracellular parasites." Infection and Immunity, **66**: 4651-4655.
243. **Yano A., Mun H. S., Chin M., Norose K., Hata K., Kobayashi M., Aosai F., Iwakura Y. (2002).** "Roles of IFN-gamma on stage conversion of an obligate intracellular protozoan parasite, *Toxoplasma gondii*." International Reviews of Immunology, **21**: 405-421.
244. **Yap G., Pesin M., Sher A. (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*." Journal of Immunology, **165**: 628-631.
245. **Yap G. S., Scharton-Kersten T., Ferguson D. J., Howe D., Suzuki Y., Sher A. (1998).** "Partially protective vaccination permits the development of latency in a normally virulent strain of *Toxoplasma gondii*." Infection and Immunity, **66**: 4382-4388.
246. **Yap G. S., Sher A. (1999).** "Cell-mediated immunity to *Toxoplasma gondii*: initiation, regulation and effector function." Immunobiology, **201**: 240-247.
247. **Yuan R. R., Spira G., Oh J., Paizi M., Casadevall A., Scharff M. D. (1998).** "Isotype switching increases efficacy of antibody protection against *Cryptococcus neoformans* infection in mice." Infection and Immunity, **66**: 1057-1062.
248. **Zenner L., Estaquier J., Darcy F., Maes P., Capron A., Cesbron-Delauw M. F. (1999).** "Protective immunity in the rat model of congenital toxoplasmosis and the potential of excreted-secreted antigens as vaccine components." Parasite Immunology, **21**: 261-272.

**PUBLICATIONS ET
COMMUNICATIONS
ISSUES DE CE TRAVAIL**

1. PUBLICATIONS

Publications directement issues de ce travail

- V. Letscher-Bru**, E. Candolfi, O. Villard, B. Risse, M. Zauke, J.P. Klein, T. Kien.
Protective effect of combined vaccination with recombinant SAG1 and IL-12 against toxoplasmosis in mice.
Infection and Immunity, 1998, 66 : 4503-4506. (IF 4,034)
- V. Letscher-Bru**, A. W. Pfaff, A. Abou-Bacar, D. Filisetti, E. Antoni, O. Villard, J-P Klein, E. Candolfi.
Vaccination with *Toxoplasma gondii* SAG1 protein is protective against congenital toxoplasmosis in BALB/c mice but not in CBA/J mice
Infection Immunity, 2003, 71 : 6615-6619. (IF 4,212)

Manuscrits en préparation

- V. Letscher-Bru**, A. W. Pfaff, A. Abou-Bacar, D. Filisetti, E. Antoni, O. Villard, J-P Klein, E. Candolfi.
Protective role and mechanisms of action of anti-SAG1 antibodies against in BALB/c mice congenital toxoplasmosis.
Soumission prévue fin 2004.
- V. Letscher-Bru**, A. W. Pfaff, A. Abou-Bacar, D. Filisetti, E. Antoni, O. Villard, J-P Klein, E. Candolfi.
Vaccination with *Toxoplasma gondii* SAG1 protein induces a protective cytotoxic CD8+ T cell immunity against congenital toxoplasmosis in BALB/c mice.
Soumission prévue début 2005.

Publications de l'équipe

- Abou-Bacar, A. W. Pfaff, S. Georges, **V. Letscher-Bru**, D. Filisetti, O. Villard, E. Antoni, J-P. Klein, E. Candolfi.
Role of NK cells and gamma interferon in transplacental passage of *Toxoplasma gondii* in a mouse model of primary infection.
Infection and Immunity, 2004, 72 : 1397-1401. (IF 4,212)
- A. W. Pfaff, S. Georges, A. Abou-Bacar, **V. Letscher-Bru**, R. Rajapakse, J-P. Klein, E. Candolfi.
Regulation of ICAM-1 mediated adhesion of monocytes to trophoblasts by inflammatory cytokines secreted during *Toxoplasma gondii* infection.
Infection and Immunity, sous presse.
- A. Abou-Bacar, A.W.Pfaff, **V. Letscher-Bru**, D. Filisetti, R. Rajapakse, E. Antoni, O. Villard, J-P. Klein, E. Candolfi.
Role of gamma interferon and T cells in congenital *Toxoplasma* transmission.
Parasite Immunology, sous presse.

2. COMMUNICATIONS

Communications orales directement issues du travail

- V. Letscher-Bru**, E. Candolfi, O. Villard, B. Risse, M. Zauke, J.P. Klein, T. Kien.
Effet de l'immunisation par la protéine recombinante SAG1 (rSAG1) de *Toxoplasma gondii* associée ou non à l'interleukine-12 dans un modèle murin de toxoplasmose.
Société Française d'Immunologie, 26-28 novembre 1997, Marseille.
- V. Letscher-Bru**, E. Antoni, O. Villard, D. Filisetti, A. Abou Bacar, E. Candolfi.
Recombinant SAG1 vaccination reduces vertical transmission of *Toxoplasma gondii* in a murine model of congenital toxoplasmosis.
International Congress on Toxoplasmosis, 21-25 mai 2001, Freising, Allemagne.
- V. Letscher-Bru**, E. Antoni, A. Abou-Bacar, A.W. Pfaff, O. Villard, J.P. Klein, E. Candolfi.
Rôle des anticorps dans la protection conférée par la vaccination avec la protéine SAG1 de *Toxoplasma gondii* dans un modèle de toxoplasmose congénitale.
Réunion du Club Toxo, Société Française de Parasitologie, 26 mai 2004, Paris.

Communications de l'équipe

- E. Candolfi, R. Robert, O. Villard, **V. Letscher-Bru**, E. Antoni, T. Kien.
SAG1 vaccination in association with IL-12 as an adjuvant enhances resistance of pregnant mice to toxoplasmosis but facilitate transplacental passage of the parasite to the fetus.
Immunity in Early Life, 17-19 novembre 1997, Annecy.
- A. Abou-Bacar, O. Villard, **V. Letscher-Bru**, D. Filisetti, T. Kien, J.P. Klein, E. Candolfi.
Analyse de la réponse immune placentaire dans un modèle expérimental murin de toxoplasmose congénitale.
Société Française de Parasitologie, 19-20 Mai 1999, Strasbourg.
- A. Abou-Bacar, O. Villard, **V. Letscher-Bru**, D. Filisetti, E. Antoni, J.P. Klein, E. Candolfi.
Host resistance in transgenic mice during congenital toxoplasmosis.
Club Cytokines de la Société Française d'Immunologie, 7-8 juin 2001, Le Croisic.
- A. Abou-Bacar, D. Filisetti, **V. Letscher-Bru**, O. Villard, A. Pfaff, J.P. Klein, E. Candolfi.
Maternal NK cells but not IFN- γ help to prevent transplacental passage of *Toxoplasma gondii* in RAG-2^{-/-} Balb/c mice.
Société Française d'Immunologie, 27-29 novembre 2002, Strasbourg.
- R. Rajapakse, A. W. Pfaff, A. Abou-Bacar, **V. Letscher-Bru**, L. Marcellin, B. Uring-Lambert, J-P. Klein, E. Candolfi.
1,25(OH)₂D₃ enhances the susceptibility of BALB/c mice to *Toxoplasma gondii*.
Vitamin-D Congress, 6-10 juillet 2003, Maastricht, Pays-Bas.