UNIVERSITÉ FRANÇOIS - RABELAIS

DE TOURS

ÉCOLE DOCTORALE Santé, Sciences et Technologie

UMR 483 Université-INRA, Laboratoire d'Immunologie Parasitaire, Vaccinologie et Biothérapies Anti-Infectieuses

THÈSE présentée par :

Dorsaf HEDHLI

Soutenue le : **17 Décembre 2008**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université François - Rabelais**

Discipline/ Spécialité : Sciences de la vie et de la santé/ Immunologie-Vaccinologie

Etude de l'effet prophylactique, propriétés immunogènes et effet adjuvant, de la profiline des Apicomplexess contre la toxoplasmose chronique en modèle murin.

THÈSE dirigée par :

Mme. Marie Noëlle MEVELEC	Chargée de recherche (HDR), INRA, Tours

RAPPORTEURS :

M. Ermanno CANDOLFI	Professeur, Université Strasbourg I
Mme. Valérie QUESNIAUX	Directeur de recherche, CNRS, Orléans

JURY :

M. Bernard CHARLEY	Directeur de recherche, INRA, Jouy-en-Josas
M. Ermanno CANDOLFI	Professeur, Université Strasbourg I
M. Fabrice LAURENT	Directeur de recherche, INRA, Tours
Mme. Isabelle DIMIER-POISSON	Professeur, Université François-Rabelais, Tours
Mme. Marie Noëlle MEVELEC	Chargée de recherche (HDR), INRA, Tours
Mme. Valérie QUESNIAUX	Directeur de recherche, CNRS, Orléans

Remerciements

Je remercie en premier lieu les Pr Bout et Dimier-Poisson qui m'ont accueillie au sein de leur laboratoire pendant ces trois années de thèse.
Je tiens à témoigner ma reconnaissance à Monsieur Ermanno Candolfi et à Madame Valérie Quésniaux d'avoir accepté d'être rapporteurs de ma thèse et d'avoir consacré de leur temps à la lecture, l'analyse et la critique de ce travail.

Je voudrais remercier également Monsieur Bernard Charley et Monsieur Fabrice Laurent d'avoir accepté de faire partie du jury et d'examiner cette thèse

Je tiens également à exprimer ma gratitude à Madame Marie Noëlle Mévélec pour sa disponibilité, son encadrement et ses qualités humaines. Merci pour ta patience et ton soutien.

Je remercie tous les membres de l'équipe du laboratoire d'Immunologie Parasitaire et Vaccinologie, pour leur aide et assistance ; Jean-Marie pour son aide à chaque fois que j'avais un souci informatique, Josette pour les magnifiques photos d'immunofluorescence, ses phrases cultes et sa bonne humeur. Stéphanie pour sa serviabilité, Nathalie pour ses conseils, Dany puis Sylvie pour leurs services.

Un grand merci à mes amis, qui m'ont énormément soutenue, pour les moments de complicité et fous rires. Je leur souhaite à chacun(e) plein de réussite et de bonheur.

Merci infiniment à ma famille, particulièrement à mes parents qui m'ont soutenue tout au long de mes études et continuent à me soutenir, j'espère que vous trouverez ce travail à la hauteur de vos sacrifices. Merci à ma sœur et à mon petit frère qui malgré la distance ont su et continué à m'encourager.

Je dédie ce travail à la mémoire de ma grand-mère qui nous a quitté avant de voir aboutir le fruit de ses prières et de ses sacrifices, ta mémoire restera à jamais gravée dans mon cœur.

Résumé

Toxoplasma gondii, protozoaire intracellulaire obligatoire, est l'agent responsable de la toxoplasmose, infection qui revêt un caractère sévère au cours de toxoplasmoses cérébrales ou congénitales en médecines humaine et vétérinaire. Aucun vaccin n'est actuellement disponible ; le développement de stratégies vaccinales efficaces s'impose.
Au cours de notre étude nous avons développé deux approches vaccinales basées sur l'utilisation des profilines des apicomplexes en tant qu'immunogène d'une part et en tant qu'adjuvant d'autre part, contre la toxoplasmose chronique chez la souris.

Dans une stratégie de vaccination ADN, les profilines de *T. gondii* et de *N. caninum,* exprimées sous formes sécrétées par un vecteur bicistronique optimisé codant à la fois pour l'antigène et une molécule adjuvante le GM-CSF, induisent des réponses humorale et cellulaire de type Th1 et confèrent une protection (réduction du nombre de kystes cérébraux de 40%). La forme cytoplasmique de la profiline de *T. gondii* induit une réponse humorale similaire, une réponse cellulaire moindre et ne confère pas de protection.

La profiline d'*Eimeria tenella* (protéine recombinante rEA) a été utilisée en tant qu'agoniste de Toll Like Recepteur (TLR 11) dans une stratégie d'immunisation par voie intrapéritonéale et nasale avec de l'extrait parasitaire de *T. gondii*. Par voie intrapéritonéale, rEA augmente les réponses humorale et cellulaire (Th1) et la protection par rapport aux souris immunisées avec l'extrait parasitaire seul (62% de réduction du nombre de kystes contre 36% seulement pour le lot immunisé avec l'extrait parasitaire seul). Par voie nasale, rEA augmente les réponses immunes de façon moindre. Néanmoins, une protection significative contre la phase chronique de l'infection est observée chez les souris immunisées avec l'extrait parasitaire associé à la protéine rEA (réduction de la charge parasitaire de 50 %) alors que les souris immunisées avec l'extrait seul ne sont pas protégées.

Mots clés : *Toxoplasma gondii,* vaccination, profiline des apicomplexes.

Summary

Toxoplasma gondii, an obligate intracellular protozoan, is the etiological agent of toxoplasmosis. This infection has severe consequences during cerebral or congenital toxoplasmosis both in human and veterinary medicines. No vaccine is currently available, so the design of efficient vaccine strategies is still a topical question.

In this study, both the immunogenicity and the adjuvant properties of apicomplexan profilins were evaluated in a vaccine strategy against chronic infection in mice.

DNA vaccination with *T. gondii* profilin and *N. caninum* profilin, expressed as secreted forms by bicistronic vectors which encode both the antigen and the adjuvant GM-CSF, induced humoral and cellular responses (Th1) and conferred protection (40% brain cysts reduction). The cytoplasmic form of *T. gondii* profilin induced a similar humoral response but a lower cellular immune response and did not confer protection.

Recombinant *Eimeria tenella* profilin (rEA) was used as an agonist of TLR 11 within a strategy of immunization by intraperitoneal and nasal routes in combination with *T. gondii* antigen extract. By intraperitoneal route, rEA enhanced humoral and cellular immune responses and conferred a better protection in mice compared to mice immunized with *T. gondii* antigen alone (62% brain cysts reduction versus 32%). By nasal route, rEA enhanced both humoral and cellular immune responses (Th1) but to a less extent compared to the intraperitoneal route. However, a significant protection was observed (50% brain cysts reduction) compared to mice immunized with *T. gondii* antigen alone, which were not protected.

Key words: *Toxoplasma gondii*, vaccination, profilins of apicomplexa.

Sommaire

Introduction 13
Revue bibliographique 16

A- *T. gondii* et Toxoplasmose

I- Historique 17
II- Description du parasite 17
II-1- Le tachyzoïte ……..18
II-2- Le bradyzoïte…….. 20
II-3- Le sporozoïte……...22
III- Le cycle parasitaire 22
III-1- Cycle sexué chez l'hôte définitif…… 23
III-2- Cycle asexué chez l'hôte intermédiaire……..24
IV- Génétique et virulence de *T. gondii* 26
V- Facteurs de virulence 28
VI- Parasite intracellulaire obligatoire 29
VI-1- Motilité et invasion……....32
VI-1-1- Rôle de la profiline dans la motilité et l'invasion…….. .33
VI-1-2- Rôle de la myosine dans la motilité et l'invasion…….. .36
VI-2- Attachement du parasite à la cellule hôte…… .36
VI-2-1-Rôle des micronèmes……...36
VI-2-1-Autres protéines impliquées dans l'attachement…….38
VI-3- La jonction mobile…….39
VI-4- Formation de la vacuole parasitophore……..39
VI-5- Maturation de la vacuole parasitophore…….40
VII- La toxoplasmose : manifestations cliniques 41
VI-1 La toxoplasmose humaine……...43
VI-1-1- La toxoplasmose chez le sujet immunocompétent…….43
a- la toxoplasmose ganglionnaire…….43
b- la toxoplasmose oculaire……..43
VI-1-2- La toxoplasmose chez le sujet immunodéprimé……... .43
a- La toxoplasmose cérébrale……....44
b- La toxoplasmose oculaire…….....44
VI-1-3- La toxoplasmose congénitale…….44
VII-2- La toxoplasmose animale……..45

B- L'immunité contre *T. gondii*

I- La réponse innée : première ligne de défense contre *T.gondii* 46
I-1- Schéma de l'immunité innée……47
I-2- Rôle des entérocytes dans l'immunité innée contre toxoplasma…….49
I-3- Rôle des neutrophiles, cellules dendritiques, macrophages et des Natural killer dans l'immunité innée contre toxoplasma……. 49
I-3-1- Les Neutrophiles…….. 49
I-3-2- Les Cellules dendritiques…….50
I-3-3- les Macrophages……...50
I-3-4- Les Natural Killer…… 51

I-4- Rôle majeur de l'IFN-γ dans la réponse innée……51
I-4-1- Le NO et le toxoplasme……..52
I-4-2- Les p47 GTPases et l'immunité innée contre le toxoplasme ……...53
I-4-3- Les intermédiaires réactifs de l'oxygène (ROI) ……...53
I-4-4- La privation en fer…….54
I-4-5-Le manque de tryptophane…….54
I-5- Rôle de l'IL-12 dans la réponse innée…….54
I-6- La famille des Toll like recepteurs et *T. gondii* ……..57
I-6-1- Les TLRs et leurs voies de signalisation……...57
I-6-2- Rôle des TLRs dans la reconnaissance de composants microbiens
I-6-3- Les TLRs impliqués dans la reconnaissance de *T.gondii*……..62
I-7-La distribution cellulaire des TLRs……...64
I-7-1- La distribution tissulaire des TLR chez l'homme……..64
I-7-2- La distribution tissulaire du TLR11 murin……65
I-8- La subversion du système immunitaire innée par *T. gondii* ……66

II- L'immunité adaptative 68
II-1- Présentation des antigènes au système immunitaire…….68
II-1-1- La voie de présentation par CMH de classe I ……..68
a- La voie endogène
b- La cross-présentation
II-1-2- La voie de présentation par CMH de classe II ……69

II-2- La présentation CMHI, CMHII de *T. gondii* …… .72
II-3- Immunité à médiation humorale……..73
II-3-1- Détection et cinétique de la réponse humorale……73
II-3-2- Etude du rôle de la réponse humorale *in vitro*……75
II-3-3- Etude du rôle de la réponse humorale *in vivo*……. 76
II-3-4- Rôle des lymphocytes B…… ..77

II-4- L'immunité à médiation cellulaire …….78
II-4-1- Rôle de l'IFN-γ……78
II-4-2- Activation des lymphocytes TCD8+ et TCD4+……...79

a- Les lymphocytes cytotoxiques T CD8+
b- Rôle effecteur des lymphocytes T CD4+

II-5- Régulation de la réponse immune ……..84

C- La Vaccination contre le toxoplasme

I- Les vaccins vivants 85
I-1- Souches atténuées (mutations non identifiées)…….....85
I-1-1 La souche ts4…….85
I-1-2- La souche incomplète S48 de *T. gondii* ……..86
I-1-3-La souche T-263……....86
I-2- Souches atténuées par invalidation de gènes identifiés……...87
I-2-1 La souche RH invalidée ……87
I-2-2 La souche RH invalidée pour les gènes MIC1 et MIC3 ……...87

II- Les vaccins à ADN 88

II-1- Introduction……88
II- 2- Le principe de construction d'un ADN nu …… ..88

III- Les voies d'administration 89
III-1- La voie intradermique : technique biolistique (le pistolet à gène)…….89
III-2- La voie intramusculaire : électrotransfert d'ADN ……90

IV- La stimulation du système immunitaire par les vaccins ADN 90

V- Avantages et inconvénients du vaccin ADN 93
V-1- Avantages de la vaccination ADN ……....93
V-2- Inconvénients de la vaccination ADN ……..94

VI -La vaccination ADN contre le toxoplasme 94
VI-1- Essais de vaccination avec les gènes de protéines de surface ……..94
VI-2- Essais de vaccination avec les gènes de granules denses……...96
VI-3- Essais de vaccination avec les gènes de rhoptries……..97
VI-4- Essais de vaccination avec les gènes des micronèmes ……..98
VI-5- Essais de vaccination avec les gènes de heat choc protein…….98

VII- Optimisation de la vaccination ADN contre le Toxoplasme 99
VII-1- La prévention de la toxoplasmose aiguë……...101
VII-2- La prévention de la toxoplasmose chronique……102
VII-3- La prévention contre la toxoplasmose congénitale……. 103

D- Utilisation des TLR comme cible thérapeutique

I- Utilisation des agonistes de TLR comme adjuvants en vaccination 104
I-1- Les agonistes du TLR-4 comme adjuvants ……...105
I-2- Les agonistes du TLR-9 comme adjuvants ……..106
I-3- Les agonistes des TLR7/8 comme adjuvants ……...107

II- Les antagonistes des TLRs 110

OBJECTIFS 111

ARTICLE I : Further analysis of protection induced by the MIC3 DNA vaccine. A major role of CD4+ and CD8+……...116
ARTICLE II : Evaluation of protective effect of DNA vaccines encoding the *T. gondii* profilin against chronical infection in mice…….147
ARTICLE III : Protective immunity against *Toxoplasma* challenge in mice by coadministration of *T. gondii* antigens and *Eimeria* profilin-like protein as an adjuvant……....182

DISCUSSION ET PERSPECTIVES 220
REFERENCES BIBLOGRAPHIQUES 229
ANNEXES 281

Liste des tableaux

Tableau 1 : Taux de séropositivité au toxoplasme en Europe, en Amérique et au sud de l'Asie (d'après Sukthana 2006)
Tableau 2 : TLR et leurs ligands (d'après Krishan et al ; 2007)
Tableau 3 : Les agonistes de TLRs en cours de développement clinique en tant qu'adjuvants de vaccins.

Liste des figures

Fig1 : Représentation schématique d'un tachyzoïte et d'un bradyzoïte de *T.gondii*

Fig2: Tachyzoïtes au May-Grunward Giesma

Fig3 : Ultrastructure de *T. gondii* (bradyzoïtes)

Fig4 : Cycle biologique de *T.gondii*

Fig5: Oocystes

Fig6: Rupture de la paroi d'un kyste et libération de centaines de bradyzoïtes sous l'action des sucs digestifs.

Fig7: Représentation schématique des différentes étapes de l'invasion illustrée par des photos d'immunofluorescence

Fig8: Alignement des séquences en acides aminés des différentes profilines d'apicomplexes

Fig9 : Élongation des filaments d'actine mettant en jeu à la fois la formine et la profiline.

Fig10: Illustration schématique des protéines de micronèmes solubles et transmembranaires de *T. gondii*.

Fig11: Schéma représentatif de l'immunité anti-toxoplasmique, humorale et cellulaire, locale et systémique.

Fig12 : Les TLRs sont des protéines transmembranaires

Fig13: La signalisation via les TLRs classée en MyD88-dépendante et MyD88-indépendante.

Fig14 : Présentation des antigènes aux lymphocytes T dans le cadre de la molécule du CMH.

Fig15: L'induction d'une immunité cellulaire et humorale par la vaccination ADN (d'après Kutzler et *al*, Décembre 2008)

Liste des abréviations

ADN: acide désoxyribonucléique

ARNm : acide ribonucléique messager

ATPase: adenosine triphosphatase

CCL: chemokine ligand

CCR : Chemokine motif CC receptor

CD : cellules dendritiques

CHO: chinese hamster ovary cell line

CMH: complexe majeur d'histocompatibilité

CMV: cytomégalovirus

CPA : celles présentatrices d'antigènes

CTL: cytotoxicité lymphocytaire

DAD domain : self-regulatory diaphanous auto-inhibitory domain

ELISA: Enzyme linked immunosorbent assay

GM-CSF: Granulocyte Macrophage- Colony Stimulating Factor

T. gondii : *Toxoplasma gondii*

GPI: glycosyl-phosphatidyl-inositol

GRA: protéines de granules denses

HEK293: Human Embryonic Kidney

HFF : hamster fœtal fibroblaste

HIF1: hypoxia-inducible factor 1

HPV : papillomavirus humain

HSP: Heat Shock Protein

IDO : indolamine dioxygenase

IFN-γ: Interféron gamma

IgA: Immunoglobuline A

IgG: Immunoglobuline G

IGTP : GTPase interféron inductible

IL: Interleukine

iNOD: oxyde nitrique synthase inductible

iNOS : nitrique oxyde synthase inhibitor

IQ : imidazoquinoline

kDa: kilo daltone

KO : knokout

LBP: LPS binding protein

LIE: lymphocytes intraépithéliale

LPS: lipopolysaccharides

LRR: Leucin-Rich Repeats

MAL: MyD88 adapter like

MICs: Micronèmes

MPL : monophosphoryl lipide

MVP: vacuole parasitophore

MyD88 :Myeloid differentiation primary response gene 88

NF-κB: Nuclear Factor –kapper B

NKT : Natural Killer T

NO: oxyde nitrique

NOS : nitrique oxyde synthase

PAMP : Pathogen-Associated Molecular Patterns

PCR : Polymerase Chain Reaction

PMN: polymorphonucléaires

PRRs: Pattern-Recognition Receptors

RE: reticulum endoplasmique

rEA: recombinant Eimeria antigen

ROI : intermédiaires réactifs de l'oxygène

ROP :Rhoptrie

SAG1: protéine de surface de *T.gondii*

SDS: Sodium dodecyl Sulfate

SIDA: Syndrome de l'immunodéficience acquise

TAP: transporter associated with antigen processing

TGF-β: Tumor Growth factor beta

TgMyo: *Toxoplasma gondii* myosine

Th: T helper

TIR: Toll/IL-1 receptor

TLR: Toll Like Receptors

TNF-α: Tumor Necrosis Factor

TRAM: Trif Related Adapter Molecule

TRIF: TIR-domain-containing-adapter inducing interferon-β

WASP : Wiskott Aldrich Syndrome Protein

µm: micomètre

Introduction

La toxoplasmose est une zoonose cosmopolite due à un parasite protozoaire intracellulaire obligatoire, *Toxoplasma gondii*, qui infecte tous les animaux à sang chaud y compris l'homme. En médecine humaine, cette maladie est généralement bénigne chez l'individu immunocompétent mais peut cependant revêtir deux formes graves : la toxoplasmose congénitale et la toxoplasmose cérébrale. Chez la femme enceinte une primo-infection peut conduire à la mort du fœtus ou à des infections congénitales sévères pouvant se développer à la naissance ou au cours de la croissance. D'autres part, chez les patients immunodéprimés en raison d'un traitement immunodépressif suite à une greffe d'organe ou du au syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA), les kystes cérébraux se réactivent et les formes parasitaires de nouveau disséminées entraînent des nécroses pulmonaires, myocardiques, hépatiques et cérébrales, pouvant conduire à la mort de l'individu. De ce fait, la toxoplasmose peut être considérée comme une infection opportuniste. En médecine vétérinaire, la toxoplasmose représente également un impact économique important puisqu'elle est à l'origine de nombreux avortements chez les petits ruminants d'élevage. Ces animaux infectés représentent de plus un réservoir pour le parasite, source de l'infection de l'homme suite à la consommation de viande mal cuite d'animaux infectés. Le toxoplasme est donc à la fois un problème de santé publique et vétérinaire, ce qui justifie la mise en œuvre de recherches consacrées à cette infection, notamment en ce qui concerne l'étude de la réponse immune protectrice de l'hôte vis-à-vis de *T.gondii*. En raison de l'importance de la toxoplasmose en médecine humaine et vétérinaire, et de l'absence de vaccins adaptés ou qui protègent totalement contre cette maladie, la nécessité d'effectuer des recherches dans ce sens s'impose, d'où l'objectif principal de ce travail.

La primo-infection par *T.gondii* met en place précocement une réponse immunitaire spécifique protectrice contre la réinfection, ce qui permet d'envisager la mise au point d'une approche vaccinale contre ce parasite.

L'immunité protectrice développée contre *T. gondii* est très complexe et fait intervenir non seulement des composantes humorale et cellulaire, mais requièrt aussi la coopération entre les systèmes immunitaires inné et adaptatif. Récemment, l'implication du TLR11 dans la reconnaissance et la mise en place d'une réponse protectrice contre la toxoplasmose chronique a été démontrée. La profiline de *T.gondii* et plus généralement les profilines des apicomplexes ont été identifiées comme ligand du TLR11. Par ailleurs, la profiline de *T. gondii* a été décrite comme fortement immunogène. Elle induit une réponse cellulaire spécifique de type Th1, réponse dépendante de l'activation du TLR11.

L'implication des TLRs dans les réponses immunes contre diverses infections et maladies auto-immunes a largement été décrite, ce qui fait de cette famille de récepteurs une cible thérapeutique de choix dans une stratégie vaccinale.

Sur la base de ces données, nous avons développé deux approches vaccinales contre la toxoplasmose chronique chez la souris. La première utilise les profilines des apicomplexes en tant qu'immunogène la seconde utilise leur propriété adjuvante.

La vaccination par l'ADN représente une nouvelle stratégie de lutte contre des agents pathogènes. Cette stratégie a déjà prouvé son efficacité protectrice contre des infections virales, bactériennes et parasitaires. La vaccination ADN permet également d'associer au sein d'un même vaccin des molécules d'ADN permettant l'expression de différents antigènes, de cytokines ou toutes autres protéines, offrant ainsi de nombreuses possibilités pour optimiser l'efficacité de ces vaccins. Nous avons dans un premier temps développé une approche vaccinale avec les séquences codant pour la profiline de *T. gondii* et de *N. caninum*, la profiline de *N. caninum* présente 96% d'homologie de séquence avec celle de *T.gondii* ce qui constitue un atout pour son utilisation en vaccination contre le toxoplasme. Cette approche a été optimisée par l'utilisation d'un vecteur bicistronique portant en plus de la séquence codant la profiline, celle du GM-CSF (Granulocytes-Macrophages colony Stimulating Factor). De plus la profiline a été clonée avec une séquence signal pour obtenir une forme sécrétée afin de faciliter la mise en place des réponses immunes. Les deux formes, cytoplasmique et sécrétée ont été comparées.

Dans un deuxième temps, nous avons étudié l'effet adjuvant de la profiline des apicomplexes dans le cadre d'une vaccination protéique avec de l'extrait parasitaire du toxoplasme en utilisant la profiline recombinante d'*Eimeria tenella* (rEA : recombinante *Eimeria* antigen). Deux voies ont été expérimentées, une première voie intrapéritonéale puisque la protéine rEA a déjà fait ses preuves en vaccination thérapeutique contre l'évolution des tumeurs cancéreuses et les infections virales par cette voie. La seconde voie est la voie muqueuse, d'une part parce que la muqueuse intestinale est la première porte d'entrée du parasite, il paraissait donc judicieux de cibler les défenses immunes locales, d'autre part cette voie induit également une réponse systémique efficace. La voie nasale a été préférée à la voie orale pour réduire les risques liés aux dégradations des protéines.

Ces essais de vaccination ont été réalisés en modèle murin. Nous avons utilisé les souris CBA/J pour étudier l'efficacité de nos protocoles de vaccination contre la toxoplasmose chronique.

Revue Bibliographique

A- *T. gondii* et Toxoplasmose

I- Historique :

Les données sur le toxoplasme ont été acquises très progressivement, le parasite a été découvert uniquement sous sa forme tachyzoïte dans les tissus d'un rongeur (*Ctenodactylus gondii*, en Tunisie par Charles Nicolle en 1908 (Nicolle et Manceaux, 1908) et simultanément au Brésil chez un lapin. Les notions concernant son cycle et son importance en pathologie humaine et animale sont alors inconnues. C'est entre 1920 et 1930 qu'apparaissent les premiers cas de toxoplasmose humaine (toxoplasmose congénitale avec manifestations oculaires en 1923, un cas d'encéphalite chez un enfant en 1939) ainsi que les transmissions possibles entre hôtes intermédiaires par inoculation du parasite. C'est la mise au point des premiers tests sérologiques dans les années 40 qui a permis de révéler l'importance de la prévalence de la toxoplasmose humaine.
Le rôle de la consommation de viande insuffisament cuite dans l'infection humaine n'a été clairement identifié que dans les années 1960 (Desmonts, Couvreur et al. 1965). Et ce n'est qu'en 1969 que l'identification du chat comme hôte définitif abritant les oocytes a permis de reconstituer le cycle du parasite pour comprendre ainsi le cycle d'infection des herbivores (Hutchison 1965; Frenkel, Dubey et al. 1969).

II- Description du parasite :

T. gondii est un protozoaire appartenant à l'ordre des coccidies, phylum des apicomplexes, responsable d'une infection très répandue dans le règne animal chez tous les animaux homéothermes, y compris l'Homme. C'est un parasite intracellulaire obligatoire.

Outre les organites cellulaires communs aux autres cellules eucaryotes (noyau, mitochondrie, appareil de Golgi et réticulum endoplasmique), *T. gondii* possède des organites impliqués dans le processus d'invasion cellulaire et deux organites originaux, l'apicoplaste et l'acidocalsisome.

L'apicoplaste ressemble à un plaste ayant perdu ses fonctions de photosynthèse. Cet organite aurait été acquis par un ancêtre du phylum des apicomplexes par double endosymbiose d'une algue verte. Son rôle exact est encore mal connu. Il serait le siège de

certaines voies de synthèse vitales pour le parasite, comme la biosynthèse d'acides gras (Waller, Keeling et al. 1998; Marechal and Cesbron-Delauw 2001). Des parasites modifiés, ne possédant plus d'apicoplaste, se répliquent normalement lors du premier cycle cellulaire mais meurent au cours du deuxième cycle de division (He, Shaw et al. 2001).

L'acidocalcisome est une organelle acide, dense aux électrons et riche en pyrophosphate, polyphosphate, calcium, magnésium, sodium, et zinc. Sa membrane contient de nombreux systèmes de transport. L'acidocalcisome constitue une réserve majeure de calcium intracellulaire (Moreno and Zhong 1996) et une Ca^{2+}-ATPase a été localisée dans ce compartiment, suggérant un rôle dans la régulation de la concentration de Ca^{2+} cytosolique et donc dans la signalisation intracellulaire (Luo, Vieira et al. 2001).

Le toxoplasme présente au cours de son cycle trois stades infectieux : les tachyzoïtes, les bradyzoïtes et les sporozoïtes (Dubey 1998).

II-1-Le tachyzoite

Le tachyzoïte a la forme d'un croissant de 6 à 8µm de long et 3 à 4 µg de large. Son extrémité antérieure est effilée et son extrémité postérieure arrondie. L'enveloppe du tachyzoïte est composée de 3 membranes, une membrane plasmique et 2 membranes juxtaposées formant un complexe membranaire interne constitué de vésicules aplaties. Cette membrane interne est discontinue au pôle antérieur et au pôle postérieur. Le tachyzoïte est le stade de multiplication rapide du toxoplasme, par endodyogénie, lors des phases actives de l'infection. La partie antérieure présente une structure caractéristique du phylum des apicomplexes : le complexe apical qui comporte le conoïde et les organelles sécrétoires (micronèmes, rhoptries, granules denses) (Fig1).

- le conoïde : consiste en 6 à 8 microtubules en forme de ressort et est délimité par des anneaux polaires apicaux, 2 anneaux antérieurs et un anneau postérieur. De l'anneau polaire postérieur partent des microtubules longitudinaux sur toute la longueur de la cellule qui restent proches du complexe membranaire interne.

- les organelles secrétoires

- Les rhoptries sont des organelles de forme allongée constituées d'un bulbe renflé et d'une extrémité effilée (col).

- Les micronèmes sont en forme de batonnets.

- Les granules denses sont des inclusions cytoplasmiques de forme arrondies

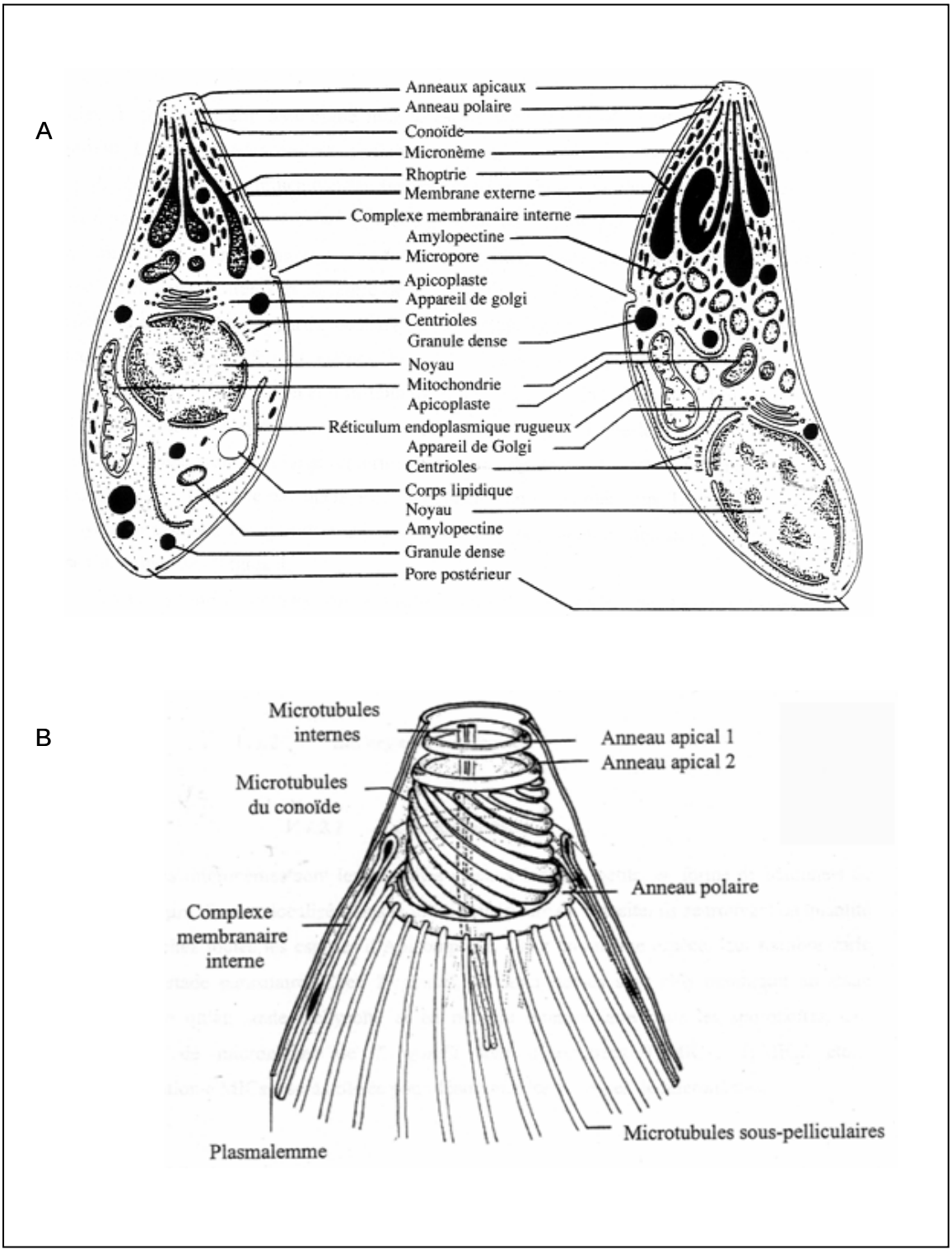


Fig1 : Représentation schématique d'un tachyzoïte (à gauche) et d'un bradyzoïte (à droite) de *T.gondii* (A) et de la partie antérieure du tachyzoïte : le conoïde (B) (d'après Dubey et *al*, 1998).

Le tachyzoïte est capable d'infecter n'importe quel type cellulaire (Carruthers and Sibley 1997). Il s'attache dans un premier temps à la membrane de la cellule hôte grâce à une interaction du type ligand-récepteur. La pénétration est un phénomène actif, très rapide (20 secondes) favorisé par les mouvements et la contraction du parasite et par les sécrétions des micronèmes et des rhoptries (celles du col). Lors de son internalisation, le parasite s'entoure d'une vacuole parasitophore limitée par une membrane. La formation et l'accroissement progressif de la membrane de la vacuole parasitophore sont le résultat de sécrétions des rhoptries (celles du bulbe). Les produits de sécrétion des granules denses interviennent également dans la formation de la vacuole. Notamment par la formation d'un réseau tubulaire intravacuolaire qui assure les échanges entre les parasites et le cytoplasme de la cellule hôte. Les tachyzoïtes se multiplient toutes les 5 à 10 heures selon les souches. La sortie hors de la vacuole parasitophore et de la cellule est également un phénomène actif.

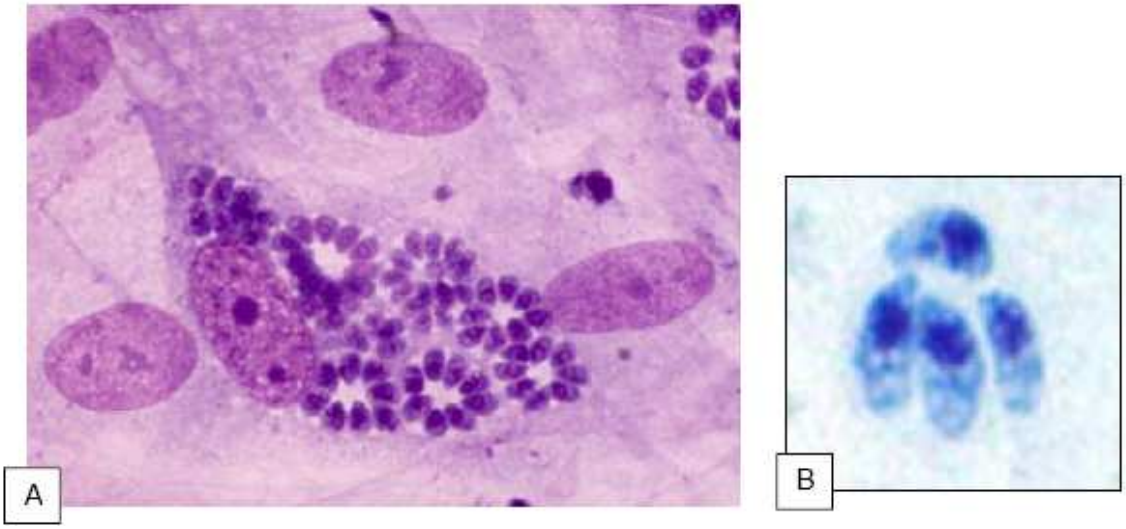


Fig 2: Tachyzoïtes au May-Grunwaerd Giesma; A. Culture cellulaire de *T.gondii* (tachyzoïtes, souche RH) sur fibroblastes MRC5 (x400); B. Tachyzoïtes libres (MO, x1000) d'aprés le rapport du groupe de travail de l'AFSAA–Décembre 2005.

II-2- Le bradyzoïte

Le bradyzoïte résulte de la transformation du stade précédent lors de l'évolution de l'infection dans l'organisme. Il se multiplie lentement dans son hôte par endogyogénie. Le bradyzoïte se distingue par des détails ultrastructuraux (noyau plus postérieur que celui du tachyzoïte, richesse en grains d'amylopectine et en micronèmes). Cette transformation s'accompagne de la modification de la vacuole parasitophore, qui

s'épaissit par le dépôt de matériel granuleux, retrouvé également au niveau de la matrice entre les bradyzoïtes. Cette paroi forme une barrière physique, protégeant les bradyzoïtes des conditions environnementales et des défenses immunitaires de l'hôte. Ainsi se constitue le kyste toxoplasmique, intracellulaire de structure sphérique qui peut mesurer de 5 à 100µm et contenir jusqu'à un millier de bradyzoïtes au métabolisme adapté à une vie quiescente (Tomavo 2001). Ces particularités structurales et métaboliques rendent le kyste et les bradyzoïtes inaccessibles, en pratique, aux traitements anti-toxoplasmiques actuels (Dubey 1998; Dubey, Lindsay et al. 1998). La transformation des tachyzoïtes en bradyzoïtes et de la vacuole parasitophore en kyste est un phénomène qui intervient dès le sixième jour après l'infection lors d'une toxoplasmose expérimentale chez la souris (Tomavo 2001). L'élément majeur déclencheur de cette transformation est une inhibition de l'activité mitochondriale des parasites sous l'influence de protéines de stress du toxoplasme induites par différents stimulis tels que l'IFN-γ, le NO, le TNF (Tomavo 2001). Les kystes peuvent se former dans tout type cellulaire mais persisteront préférentiellement dans les neurones, les astrocytes, les cellules musculaires et les cellules rétiniennes pendant toute la durée de vie de l'hôte. La paroi du kyste peut se rompre à la mort d'une cellule hôte et les bradyzoïtes se trouvent libres dans le milieu extracellulaire. Selon l'état immunitaire de l'hôte, les bradyzoïtes sont détruits par le système immunitaire, ou peuvent encore réinfecter d'autres cellules voisines pour donner de nouveaux kystes. La persistance de ces kystes entretient une immunité cellulaire qui prévient une réinfection (Dubey 1997).

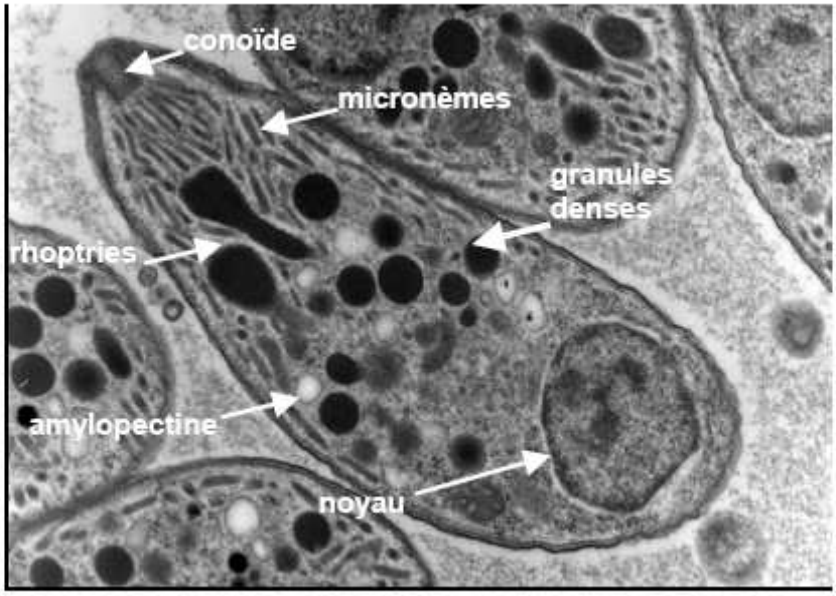


Fig 3 : Ultrastructure de *T. gondii* (bradyzoïtes), d'aprés le rapport du groupe de travail de l'AFSAA–Décembre 2005

II-3-Le stade sporozoïte

Le stade sporozoïte présent dans les oocystes sporulés est l'élément infectant résultant de la reproduction sexuée dans les cellules épithéliales du chat et d'autres félidés. Les oocystes non sporulés (10 à 12µm de diamètre) émis dans les fèces du chat contiennent une masse unique, les sporoblastes. Après sporogonie, 2 sporocystes contenant chacun 4 sporozoïtes sont présents dans les oocystes sporulés. Les sporozoïtes sont peu différents en microscopie optique et électronique des autres stades infectants (Speer and Dubey 1998). Les sporozoïtes sont capables également de pénétrer activement dans les cellules de l'hôte intermédiaire (Tilley, Fichera et al. 1997) (Fig 4).

III- Le cycle du parasite

Le cycle du parasite comprend une multiplication asexuée, qui s'effectue dans différents tissus chez les homéothermes mammifères (dont le chat), les oiseaux, appelées hôtes intermédiaires et un cycle sexué, qui s'effectue dans l'épithélium digestif du chat et des autres félidés (hôtes définitifs) (Frenkel, Dubey et al. 1970; Dubey 1998). Les voies de transmission du toxoplasme sont de deux sortes : verticale et horizontale.

- Trois voies de transmission horizontales chez l'Homme
    - Ingestion orale d'oocystes infectieux disséminés dans l'environnement (eau, végétaux…).
    - Ingestion orale de kystes tissulaires contenus dans la viande crue ou peu cuite des hôtes intermédiaires.
    - Transmission du parasite par des greffes d'organes ou transfusions sanguines de donneurs infectés (Tenter, Heckeroth et al. 2000).
- Une voie de transmission verticale de la mère à son fœtus par le passage transplacentaire des tachyzoïtes (Martin 2001).

III-1- Cycle sexué chez l'hôte définitif

Les hôtes intermédiaires du toxoplasme abritent, probablement pendant toute la durée de leur vie, les kystes intra-tissulaires contenant des centaines de bradyzoïtes. Lorsque ces hôtes intermédiaires servent de proies à des félidés (chats ou félidés sauvages), la paroi kystique est digérée par les enzymes protéolytiques du tractus digestif et les bradyzoïtes libérés envahissent les cellules épithéliales et se multiplient d'un façon asexuée par schizogonie. Survient ensuite la transformation des différentes formes asexuées du toxoplasme en gamétocytes mâles et femelles (gamétogonie) suivie d'une fécondation. La fécondation conduit à la formation d'oocystes non sporulés (non infectieux) excrétés dans les fèces des félidés 3 à 5 jours après l'ingestion de kystes et ce pendant 7 à 15 jours. Dans le milieu extérieur, ces oocystes subissent une maturation et deviennent infectieux en 1 à 5 jours après leur émission par un processus appelé sporogonie qui permet la formation de sporozoïtes. Les oocystes sporulés contiennent des sporocystes renfermant chacun 4 sporozoïtes haploïdes. Les oocystes sporulés, très résistants aux agents physiques et chimiques, peuvent à leur tour, rester quiescents pendant plus d'une année dans le sol. Ingérés par un hôte félidé, ils initient un nouveau cycle sexué. Chez l'hôte intermédiaire, ils seront à l'origine du cycle asexué.

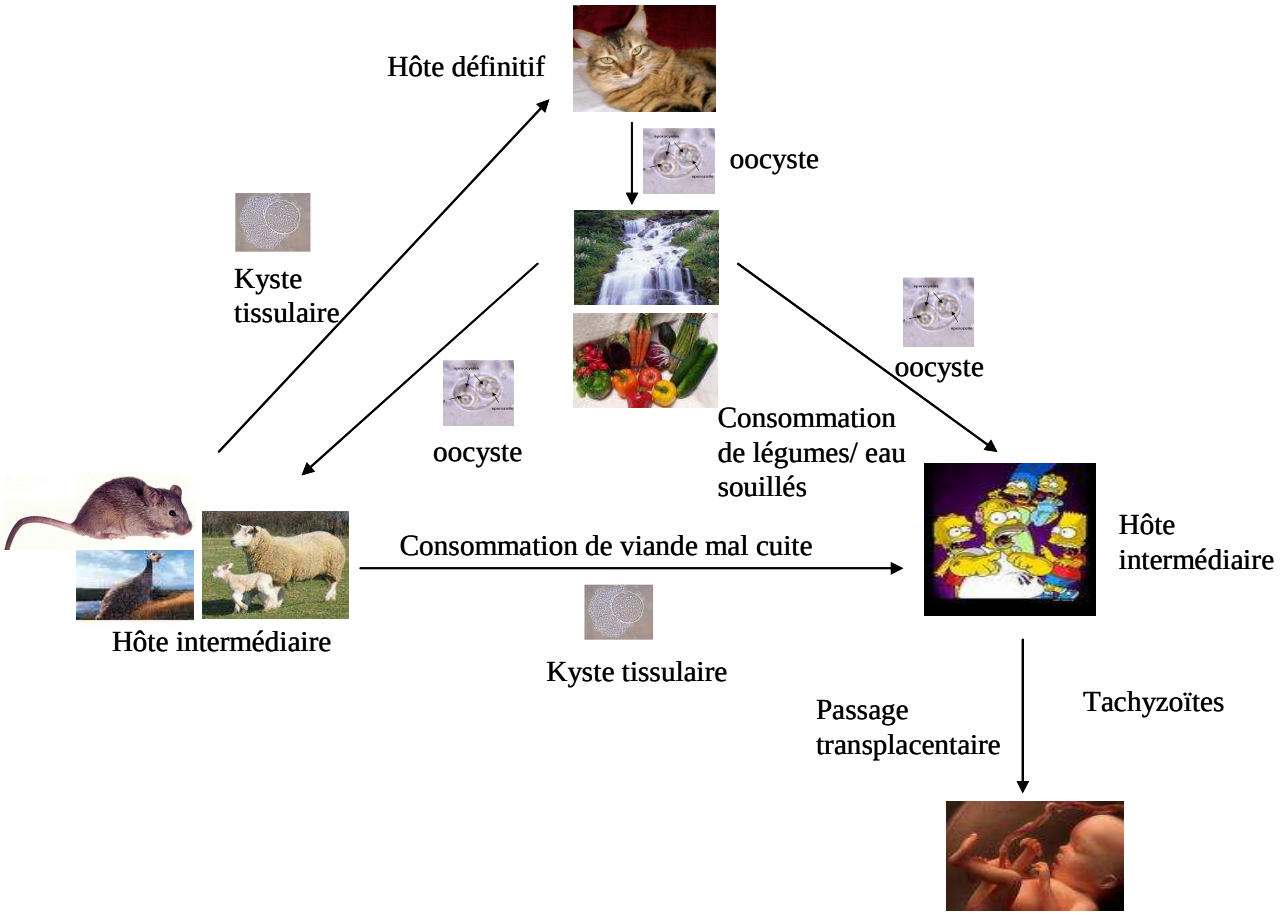


Fig 4 : Cycle biologique de *T.gondii*, reproduction sexuée du parasite au niveau du tractus digestif de l'hôte définitif (les félidés). Les oocystes une fois matures sont à l'origine de la contamination de l'eau et des animaux de rente, ces derniers avec l'Homme constituent l'hôte intèrmédiaire chez lesquels aura lieu la multiplication asexuée. L'Homme se contamine par les oocystes ou les kystes tissulaires. En cas de grossesse, les tachyzoïtes passent la barrière transplacentaire et infectent le fœtus lors d'une primo-infection.

III-2-Cycle asexué chez l'hôte intermédiaire :

Après leur ingestion par l'hôte intermédiaire, la paroi des oocystes se rompt dans l'intestin ; les sporozoïtes libérés pénètrent dans les cellules épithéliales intestinales, se transforment en tachyzoïtes qui se disséminent rapidement dans tous les organes par l'intermédiaire des monocytes/ macrophages sanguins et lymphatiques. Après une parasitémie brève, les parasites s'enkystent dans les tissus, en particulier les muscles striés et le cerveau, sources de contamination de l'hôte définitif.

Les kystes présents dans les tissus des hôtes intermédiaires sont également source de contamination pour un nouvel hôte intermédiaire (mammifères carnivores ou omnivores, oiseaux carnassiers). Après une phase de multiplication active du parasite sous forme de tachyzoïtes, ces hôtes hébergeront à leur tour des kystes toxoplasmiques quiescents.

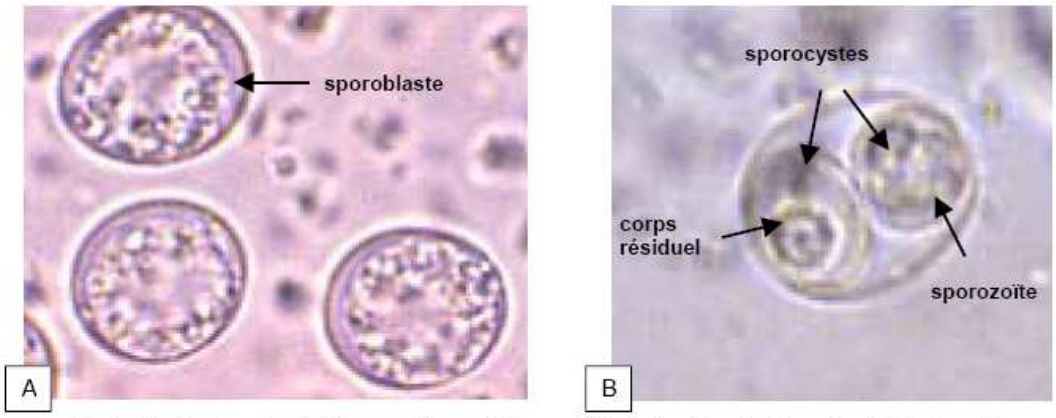


Fig5: Oocystes; A. non sporulés, non infectants à l'émission dans les féces de chat; B. sporulés, infectants après quelques jours dans le milieu extérieur. (MO, contraste de phase x1000), d'après le rapport du groupe de travail de l'AFSAA –Décembre 2005.

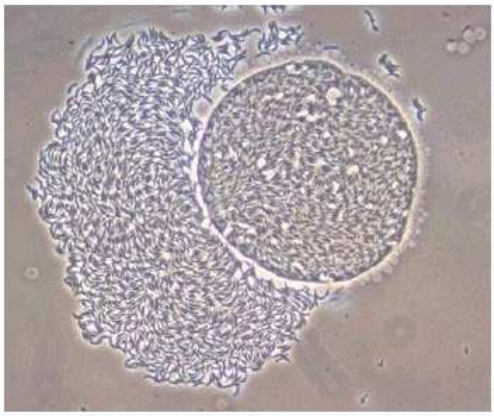


Fig 6: Rupture de la paroi d'un kyste et libération de centaines de bradyzoïtes sous l'action des sucs digestifs, d'aprés le rapport du groupe de travail de l'AFSAA – Décembre 2005.

IV- Génétique et virulence de *T.gondii*

T. gondii présente un génome de 11 chromosomes (8.10^7 paires de bases) (Sibley and Boothroyd 1992). Le génome est haploïde, seul le stade zygote présente un génome diploïde. Des souches recombinantes (combinaison des allèles classiques : I/II, I/III, II/III, I/II/III) et dites atypiques (combinaison partielle ou totale d'allèles I, II ou III) peuvent apparaître suite à un brassage génétique résultat d'une multiplication sexuée de deux souches de *T.gondii* de fonds génétiques distincts. Ce phénomène est rare, puisque le polymorphisme génétique de ce parasite est relativement faible suite à de longues phases de multiplications asexuées chez les hôtes intermédiaires permettant le maintien de clones isolés génétiquement (Boothroyd 1993). Ainsi, en Europe et en Amérique du Nord, la plupart des souches de *T. gondii* étudiées se répartissent en trois génotypes majeurs, distingués grâce à l'étude des différents marqueurs génotypiques correspondant à plusieurs antigènes majeurs du parasite (Howe and Sibley 1995). Le séquençage de marqueurs génétiques plus fins tel les microsatellites et plus récemment celui des introns, permet de différencier les différents génotypes du toxoplasme et de déterminer ainsi le génotype des différentes souches isolées lors des études cliniques ou épidémiologiques (Ajzenberg, Banuls et al. 2002; Khan, Fux et al. 2007). Ces génotypes sont considérés comme trois lignées clonales qui seraient apparues il y a 10 000 ans avec la domestication animale. Cependant en Amérique du Sud une plus grande diversité génotypique est

observée, associée à une plus grande fréquence de recombinaisons génétiques (Ferreira Ade, Vitor et al. 2006).

La virulence de *T. gondii* diffère selon que la souche responsable de l'infection est de génotype I, II ou III.

La virulence de *T. gondii* est déterminée sur la base de la DL50 chez la souris.

- Les souches de type I qui sont caractérisées par une importante virulence chez la souris telle que la souche RH. Les parasites de cette souche forment rarement des kystes. Chez la souris, ils entraînent une mort rapide en phase aiguë de l'infection.
- Les souches de type II comme la souche 76K sont moyennement virulentes, ces parasites n'induisent la mort en phase aiguë qu'à forte dose ou seulement si les souris ont une sensibilité accrue à l'infection aiguë (ex. C57BL/6). Elles sont responsables de la phase chronique de la toxoplasmose.
- Les souches de type III et atypiques sont d'une virulence intermédiaire entre les souches de type I et les souches de type II.

Certaines études se sont intéressées à l'étude de la corrélation entre le type génomique du toxoplasme et les manifestations cliniques humaines chez les sujets infectés (Saeij, Boyle et al. 2005). Aux Etats-Unis, seules les souches de type I et des souches atypiques sont retrouvées chez les sujets immunocompétents souffrant d'une toxoplasmose oculaire alors que les souches responsables des infections congénitales sont majoritairement de type II (Boothroyd and Grigg 2002). En France, chez les patients atteints du SIDA et dans les cas d'infections congénitales les souches responsables sont majoritairement de type II (Honore, Couvelard et al. 2000; Ajzenberg, Cogne et al. 2002). Cependant les rares cas impliquant des souches de type I ou atypiques laissent supposer une plus forte pathogénicité de ces génotype notamment dans les formes graves disséminées lors d'infections tardives dans le 3ème trimestre de grossesse (Fuentes, Rubio et al. 2001; Ferreira Ade, Vitor et al. 2006; Gallego, Saavedra-Matiz et al. 2006).

Les animaux semblent être un réservoir des souches II et III du toxoplasme (Boothroyd and Grigg 2002). Cependant, une étude récente sur des agneaux de moins de 1 an, aux USA, révèle une plus grande diversité génotypique avec 45,6% des souches isolées appartenant au type II, 15,7% des souches isolées appartenant au type III et 38,7% des

souches isolées étant des souches atypiques (Dubey and Jones 2008). En France, une étude menée en Haute Vienne, a montré que les isolats des moutons infectés étaient de type II (Dumetre, Ajzenberg et al. 2006). Au Brésil, les isolats des poulets infectés sont de type I et III (Dubey, Graham et al. 2002).

V- Facteurs de virulence :

Chez la souris, les souches virulentes se multiplient beaucoup plus et se disséminent plus rapidement à tout l'organisme que les souches avirulentes (Hitziger, Dellacasa et al. 2005). *In vitro* les souches virulentes ont également une plus grande capacité migratoire (Barragan and Sibley 2002; Taylor, Barragan et al, 2006).

Des croisements entre les souches de type I et III et de type II et III ont montré que les protéines de Rhoptries ROP18 et ROP16 étaient des molécules clé de la virulence (Saeij, Boyle et al. 2006; Taylor, Barragan et al. 2006; Saeij, Coller et al. 2007).

La protéine ROP18 est directement impliquée dans la multiplication du parasite. ROP18 est une kinase et appartient à la famille ROP2. Au cours de l'invasion elle est sécrétée dans le cytoplasme de la cellule hôte (évacuoles) puis elle se localise au niveau de la membrane parasitophore. ROP18 est exprimée par les souches de type I et II. Elle est très faiblement exprimée par les souches de type III du fait de la présence dans le promoteur de ces souches d'une séquence de 2.1kb près du codon d'initiation de la traduction. L'expression de ROP18 de type I par une souche de type III se traduit par une augmentation significative de la virulence et une augmentation de la réplication intracellulaire (Taylor, Barragan et al. 2006). La sur-expression de ROP18 de type I dans une souche de type II augmente également la multiplication intracellulaire (El Hajj, Lebrun et al. 2007). L'activité kinase joue un rôle majeur dans l'augmentation de la multiplication cellulaire et le gain de virulence, puisque ces effets ne sont plus observés si un acide aminé clé de la fonction kinase est muté. Le substrat de cette kinase n'est pas encore identifié. Le fait que les souches de type III n'expriment pas ou peu de protéine ROP18, laisse penser que la protéine ROP18 n'est pas indispensable à la vie du parasite.

La protéine ROP16 est impliquée dans la subversion de la signalisation intracellulaire de l'hôte. ROP16 se localise rapidement au cours de l'invasion cellulaire dans le noyau de la cellule hôte. ROP16 a une activité kinase, son substrat cellulaire n'est pas identifié mais son activité a pour effet la phosphorylation de STAT3, un régulateur négatif de la réponse cellulaire Th1. Les protéines ROP16 des souches de type I et III sont capables de phosphoryler durablement STAT3 contrairement aux souches de type II. L'expression de

la protéine ROP16 de type I dans une souche de type II a permis de relier le polymorphisme de ROP16 ainsi que la phosphorylation de STAT3 à la production d'IL-12. Ainsi, l'expression d'une protéine ROP16 de type I dans les souches de type II a pour effet une diminution de la sécrétion d'IL-12 par les macrophages infectés. *In vivo* les souches de type I, diminuent l'expression de l'Il-12 via ROP16 et se multiplient plus via ROP18 ce qui conduit finalement à la mort de l'hôte. Les souches de type II ne contrarient pas la mise en place d'une réponse immune de type Th1, ce qui va les conduire, sous la pression de la réponse immunitaire à s'enkyster et donc a persister sans tuer leur hôte. Les souches de type III ne sont pas aussi virulentes que les souches de type I, bien qu'elles agissent sur la réponse immune de l'hôte via ROP16 comme les souches de type I, car parallèlement elles n'expriment pas ou peu ROP18.

VI- *T. gondii*, parasite intracellulaire obligatoire

La multiplication de *T. gondii* est obligatoirement intracellulaire et s'effectue au sein d'une vacuole parasitophore limitée par une membrane. La membrane de la vacuole est impliquée à la fois dans le maintien de l'intégrité de la vacuole, l'acquisition des nutriments et la manipulation de certaines fonctions de la cellule selon des mécanismes qui ne sont pas encore complètement élucidés (Martin, Liu et al. 2007).

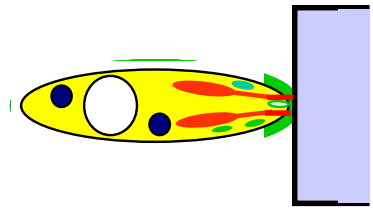
La cellule fournit certains nutriments indispensables à la survie du parasite. *T. gondii* est auxotrophe pour le tryptophane (Pfefferkorn, Eckel et al. 1986), l'arginine (Fox, Gigley et al. 2004), les polyamines (Seabra, DaMatta et al. 2004), les purines (Chaudhary, Darling et al. 2004), le cholestérol (Coppens, Sinai et al. 2000), le fer (Dimier and Bout 1998; Gail, Gross et al. 2004) et certains lipides (Charron and Sibley 2002).

La diffusion de substances de faible poids moléculaire (<1300 daltons) de la cellule hôte vers la vacuole à travers les pores de la membrane de la vacuole parasitophore permet au parasite de s'approvisionner en certains nutriments (Schwab, Beckers et al. 1994). Cependant, certains nutriments sont présents en faible quantité dans le cytoplasme ou peuvent être liés à de grosses protéines ou encore peuvent être insolubles, limitant l'acquisition par simple diffusion. Un autre mode d'acquisition de nutriments consiste en la séquestration des organelles d'endocytose de la cellule (Coppens, Dunn et al. 2006).

Pour favoriser son développement au sein de la cellule, *T. gondii* induit le facteur de transcription HIF1 « hypoxia-inducible factor 1 ». Ce facteur de transcription régule notamment des gènes impliqués dans le métabolisme du Fer et du glucose, éléments importants pour le développement du parasite (Spear, Chan et al. 2006).

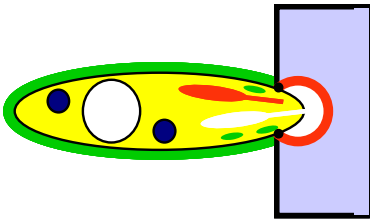
Parallèlement, pour prolonger sa survie dans la cellule et éviter son élimination rapide par les macrophages, *T. gondii* a développé des stratégies pour bloquer l'apoptose cellulaire (Laliberte and Carruthers 2008). En augmentant la capacité migratoire des cellules infectées, comme les cellules dendritiques, *T. gondii* facilite sa dissémination à travers l'hôte. Ainsi, Lambert et al ont observé *in vitro* que les cellules dendritiques infectées, migraient plus vite et passaient plus rapidement à travers les cellules endothéliales que les cellules non-infectées. *In vivo*, les cellules dendritiques injectées infectées arrivent plus rapidement dans la rate que les cellules non-infectées et la dissémination du parasite est plus rapide après l'injection de cellules dendritiques infectées que l'injection de parasites libres (Lambert, Hitziger et al. 2006).

Parasite intracellulaire obligatoire, le toxoplasme a une durée de vie limitée à quelques heures en milieu acellulaire. Sa capacité à envahir de nouvelles cellules cibles est donc capitale pour sa survie. Le toxoplasme a une absence quasi-totale de spécificité d'hôte : il est potentiellement capable d'envahir tous les types cellulaires : les cellules de vertébrés à sang chaud, les cellules de poisson et même les cellules d'insecte. Seuls les protoplastes de plantes, dont la viscosité membranaire est faible, sont résistants à l'infection (Werk and Fischer 1982). L'invasion des cellules hôtes par le toxoplasme est un phénomène actif initié et conduit par le parasite, lié à sa motilité et dépendant de l'actine et de la myosine du parasite (Morisaki, Heuser et al. 1995; Dobrowolski, Carruthers et al. 1997; Dobrowolski, Niesman et al. 1997). Le processus d'invasion est achevé en moins de 10 secondes et aboutit à la création d'un compartiment intracellulaire dans lequel le parasite va pouvoir s'installer et se multiplier. Les différents organites du complexe apical interviennent à chaque étape du processus par l'exocytose successive de leur contenu : les protéines de micronèmes interviennent dans la reconnaissance de la cellule hôte, les protéines du col des rhoptries contribuent à la formation de la jonction mobile, les protéines du bulbe des rhoptries à la formation de la vacuole parasitophore et celles des granules denses interviennent lors de la maturation de la vacuole (Carruthers and Sibley 1997; Dubremetz, Garcia-Reguet et al. 1998).

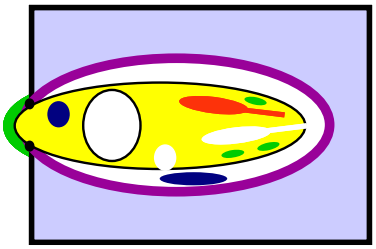


A. Contact initial du parasite avec la cellule hôte, exocytose des micronèmes, des protéines du col des rhoptries et formation de la jonction mobile.

B. Glissement du parasite prenant appui sur la jonction mobile, exocytose des rhoptries et début de formation de la vacuole parasitophore



C. Le contenu du bulbe des rhoptries contribue à la formation de la vacuole parasitophore. Le contenu des micronèmes couvre la surface du zoïte et s'accumule au fur et à mesure en arrière de la jonction mobile.



D. Extension de la vacuole parasitophore
La jonction mobile atteint la partie postérieure du zoïte et se ferme en arrière du parasite alors isolé dans la vacuole.
Le contenu des granules denses est déversé dans la vacuole et contribue à la maturation de ce compartiment.

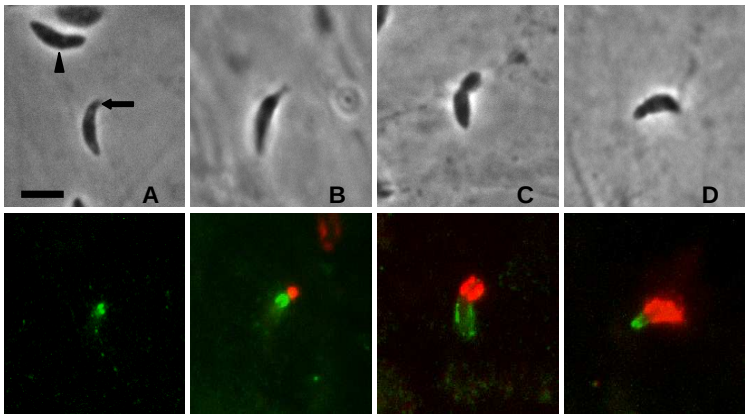


Fig 7: Représentation schématique des différentes étapes de l'invasion illustrée par des photos d'immunofluorescence montrant la localisation de MIC3 (en vert) et ROP1 (en rouge) lors d'une invasion de cellules HFF par un tachyzoïte de *T. gondii*. (Garcia-Reguet *et al.*, 2000); barre = 5µm ; (d'après Dubremetz *et al.*, 1998)

VI-1- Motilité et invasion

Les formes invasives de *T. gondii* sont motiles. La motilité et l'invasion sont intimement liées, les parasites non motiles sont incapables de pénétrer dans une cellule. Cette motilité est très particulière. Les parasites ne possèdent ni cils, ni flagelles, ils glissent sur un substrat solide, pouvant être la surface des cellules, selon une polarité antéro-postérieure. Cette motilité par glissement, spécifique des Apicomplexa est très conservée au sein du phylum. L'examen de tachyzoïtes extracellulaires de *T. gondii* par vidéomicroscopie dévoile que cette motilité par glissement consiste en une succession de plusieurs comportements stéréotypés : (i) un glissement circulaire, dans le sens des aiguilles d'une montre ; (ii) des tournoiements verticaux, toujours dans le sens des aiguilles d'une montre (le parasite restant attaché au substrat par son pôle postérieur) ; (iii) un glissement hélicoïdal, qui combiné à un flip dans le sens des aiguilles d'une montre aboutit en un déplacement vers l'avant (Hakansson, Morisaki et al. 1999). La nature directionnelle et hélicoïdale de cette motilité suggère fortement une connexion entre le système moteur du parasite et l'organisation hélicoïdale des microtubules sous pelliculaires. Au cours de son glissement selon son axe antéro-postérieur, le toxoplasme entre directement en contact avec la cellule hôte par son extrémité apicale. Les mouvements propres du conoïde peuvent contribuer à l'apposition de l'apex du parasite sur la surface cellulaire (Schwartzman and and Saffer 1992; Morisaki, Heuser et al. 1995).

La première étape dans la compréhension des mécanismes d'invasion cellulaire et de motilité par glissement des zoïtes apicomplexes vient de l'observation de la relocalisation de molécules liées à leur surface. Ce phénomène de relocalisation antéro-postérieure se produit à une vitesse similaire à celle observée pour le déplacement des zoïtes et ces deux processus sont inhibés par la cytochalasine D et les basses températures (Dubremetz and Ferreira 1978; Russell and Sinden 1981). L'absence de temps de latence entre la phase d'attachement et la phase de pénétration du parasite implique que le parasite exprime des molécules d'adhésion de surface qui participent aux deux processus par une interaction concertée avec les récepteurs cellulaires et le moteur acto-myosine du parasite. Les ligands parasitaires sécrétés à la surface du parasite au niveau du pôle antérieur, permettent un attachement fort et localisé à la surface du substrat ou de la cellule hôte, et sont connectés au moteur acto-myosine du parasite qui assure leur déplacement antéro-postérieur à la surface du parasite et donc la motilité du parasite sur

un substrat ou l'entrée du parasite dans la cellule hôte. Ces ligands parsitaires sont ensuite rejetés dans le milieu extérieur au niveau du pôle postérieur du parasite. (Sibley, Hakansson et al. 1998; Menard 2001; Soldati, Dubremetz et al. 2001; Opitz and Soldati 2002). Ce mode de motilité « glissée », dépendante d'un substrat, implique l'action concertée des adhésines sécrétées (micronèmes), du rôle moteur de la myosine, des facteurs régulant la polymérisation de l'actine et des protéases. La machinerie impliquée dans la motilité est appelée glidéosome (Keeley and Soldati 2004).

a- Rôle de la profiline dans la motilité et l'invasion

Dans les conditions physiologiques, l'actine F n'a pas pu être mise en évidence. Cependant, l'extrême susceptibilité du parasite aux drogues qui interfèrent avec la polymérisation (cytochalasine D) ou la dépolymérisation (le cyclopeptide jasplakinoide) de l'actine, confirme le rôle crucial de l'actine dans la motilité du parasite (Dobrowolski and Sibley 1997; Wetzel, Hakansson et al. 2003). Ces difficultés de mise en évidence sont dues au fait que le parasite conserve une grande quantité d'actine sous forme G et produit des filaments d'actine courts et instables (Schmitz, Grainger et al. 2005). Chez les eucaryotes, deux machineries protéiques sont responsables de la croissance des filaments par des mécanismes moléculaires distincts : le système WASP/Arp2/ 3 engendre un réseau arborescent de filaments « branchés », tandis que les formines engendrent des faisceaux de filaments linéaires parallèles. Les apicomplexa et plus particulièrement *T. gondii* n'ont pas le complexe Arp2/ 3 (Gordon, Di Sabatino et al. 2005). Par contre, la plupart des apicomplexa dont *T. gondii* ont des formines (Plattner, Yarovinsky et al. 2008) et une profiline (Yarovinsky, Zhang et al. 2005; Baum, Papenfuss et al. 2006). La profiline de *T. gondii* et des apicomplexes ont une séquence plus longue que celle généralement rencontrée chez les eucaryotes, suite à l'insertion d'une séquence d'environ 25 acides aminés en dehors des sites de liaison à l'actine et à la polyproline du domaine FH1 des formines (Fig 8). Des expériences réalisées avec la profiline de *Plasmodium* montrent que l'insertion de cette séquence ne perturbe pas l'interaction de la profiline avec ses deux ligands (Schuler and Matuschewski 2006). Par un système d'expression conditionnel, Plattner et *al* ont montré que la profiline de *T.gondii* n'était pas nécessaire à la multiplication intracellulaire. Par contre la profiline est indispensable pour la motilité, l'invasion cellulaire et la sortie active des parasites de la cellule infectée. En conséquence, la profiline est impliquée dans la virulence *in vivo* chez la souris (Plattner, Yarovinsky et al. 2008). Les formines des apicomplexes n'ont pas les domaines classiquement présents

dans ces protéines comme le domaine de liaison à la Rho GTPase, le DAD domaine (self-regulatory diaphanous autoinhibitory domain) et le motif de dimérisation. L'absence de ces domaines pose des questions sur la formation des dimères de formine et la régulation de l'assemblage des filaments (Schuler and Matuschewski 2006).

Fig 8: Alignement des séquences en acides aminés des différentes profilines d'apicomplexes, comparaison de l'homologie de séquence par rapport à la profiline de *Toxoplasma gondii, Néospora caninum* (93% d'homologie), *Cryptosporidium parvum* (63% d'homologie), *Cryptosporidium hominis* (63% d'homologie), *Eimeria tenella* (67% d'homologie), *Plasmodium falciparum* (58% d'homologie) et *Theileria parva* (53% d'homologie); d'après Yarovinsky et *al* 2005.

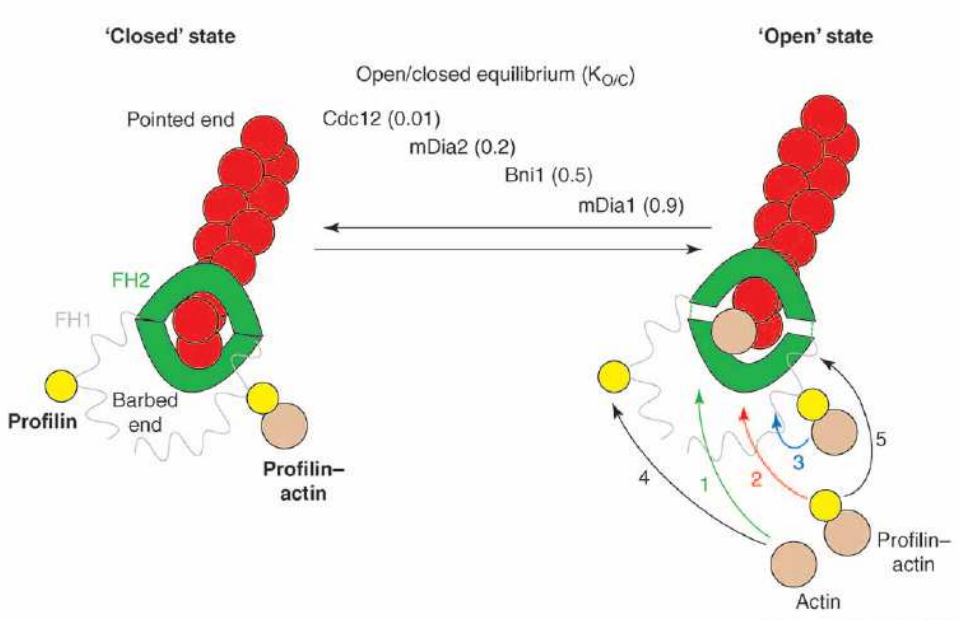


Fig9 : Élongation des filaments d'actine mettant en jeu à la fois la formine et la profiline. La fixation de la formine sur le bout barbelé du filament d'actine en élongation est assurée par le dimère FH2 qui encercle le filament d'actine. Le dimère FH2 est en équilibre (Ko/f)* entre l'état fermé qui ne permet pas l'ajout des monomères d'actine et par conséquent, l'arrêt de l'élongation du filament d'actine (gauche) et l'état ouvert qui permet l'élongation du filament d'actine (droite). Les constantes d'équilibre varient en fonction des espèces, de l'état d'équilibre fermé pour la formine de levure (Cdc12p) K(o/f)=0,01, à l'état d'équilibre ouvert pour la formine de souris (mDia1), K(o/f)=1,0. L'actine libre ou complexée à la profiline peut s'attacher au domaine FH1 riche en polyproline (voies 4 et 5). Cependant l'actine seule ou complexée à la profiline n'est ajoutée au bout barbelé que si le dimère FH2 est 'ouvert' (voies 1 et 3). La complexation de la profiline à l'actine permet de catalyser l'élongation du filament d'actine puisque le complexe profiline-actine se fixe 5 à 10 fois plus rapidement au filament d'actine en élongation que l'actine monomérique seule (d'après Kovak.D.R et *al* 2006).

b-Rôle de la myosine dans la motilité et l'invasion

Des inhibiteurs de la myosine ont montré que la myosine était impliquée dans la motilité du parasite (Dobrowolski, Carruthers et al. 1997). Plusieurs myosines ont été caractérisées chez *T. gondii*. Six appartiennent à la classe XIV, qui n'est décrite que pour les apicomplexes. Deux d'entre elles, TgMyoB et TgMyoC seraient impliquées dans le bourgeonnement et la séparation des cellules filles lors de la division endodyogénique de *T. gondii* (Delbac, Sanger et al. 2001). TgMyoA, quant à elle, participe à la motilité et à l'invasion. Elle est localisée sous la membrane plasmique. Cette localisation est déterminée par deux arginines situées dans son domaine C-terminal. L'extinction conditionnelle de l'expression de TgMyoA a permis de montrer que cette protéine était essentielle à l'invasion cellulaire. En effet, des parasites n'exprimant plus de TgMyo-A ne sont plus mobiles et ne peuvent plus envahir les cellules (Meissner, Reiss et al. 2002).

VI-2-Attachement du parasite à la cellule hôte

La notion de reconnaissance est difficile à appréhender chez le toxoplasme en raison de sa capacité à envahir de très nombreux types cellulaires. Deux hypothèses peuvent être envisagées pour expliquer cette absence de spécificité d'hôte : le parasite dispose d'une large panoplie de ligands capables d'interagir avec un ou plusieurs récepteur(s) présent(s) à la surface d'un type cellulaire précis ou/et des molécules très répandues parmi tous les types cellulaires sont impliquées (une molécule ubiquiste de matrice extracellulaire pourrait constituer un pont entre le toxoplasme et la cellule hôte).

a- Rôle des micronèmes

L'exocytose des micronèmes intervient en tout début de l'invasion comme le suggère fortement la relocalisation de plusieurs protéines de micronèmes à la surface apicale du parasite, au moment du contact initial avec la cellule hôte (Carruthers and Sibley 1997; Garcia-Reguet, Lebrun et al. 2000; Soldati, Dubremetz et al. 2001). Sur la base de leur structure primaire, les MICs peuvent être classées en deux catégories, les solubles et les transmembranaires. La caractérisation moléculaire des protéines de micronèmes a révélé une conservation frappante des domaines structuraux qui présentent de fortes homologies avec des domaines connus d'adhésion de protéines d'eucaryotes supérieurs (Tomley and Soldati 2001). Ces motifs présents aussi bien sur des MICs

solubles que transmembranaires, existent en une ou plusieurs copies. Les MICs transmembranaires adoptent une topologie transmembranaire de type I dans les organites et forment des oligomères avec des MICs solubles dès le RE (Meissner, Reiss et al. 2002). A la surface du parasite, lors de l'invasion, les MICs transmembranaires sont connectées par leur domaine C-terminal cytosolique aux structures cytosquelettiques et par le domaine N-terminal aux récepteurs cellulaires, soit directement ou indirectement via les MICs solubles avec lesquelles elles forment des complexes. Le complexe TgMIC2/M2AP joue un rôle critique dans la motilité, l'attachement et l'invasion (Huynh, Opitz et al. 2004; Huynh and Carruthers 2006). La délétion du gène *mic1* entraîne la rétention dans le RE/Golgi de MIC4 et MIC6, une diminution *in vitro* de l'invasion des fibroblastes (HFF) et une légère diminution de la virulence *in vivo* (Cerede, Dubremetz et al. 2005). La délétion du gène *mic3* n'a pas d'effet sur son escorteur MIC8 qui est correctement adressé aux micronèmes, MIC3 ne semble pas impliquée dans l'invasion de fibroblastes (HFF) *in vitro*, par contre une légère diminution de la virulence est observée *in vivo* (Cerede, Dubremetz et al. 2002). Si la virulence des simples mutants n'est que très légèrement diminuée, par contre, 90% des souris ayant été infectées par le double mutant mic1-3KO survivent à l'infection, indiquant clairement un défaut de virulence en l'absence de MIC1/3/4/6. La virulence des parasites délétés des gènes MIC1 et MIC3 n'est pas restaurée par la recomplémentation de ces parasites avec une protéine MIC3 mutée, ne présentant plus d'affinité pour la surface des cellules. *In vivo*, la virulence est donc liée à l'affinité de MIC3 pour la surface des cellules.

Les parasites délétés du gène de MIC8 ne sont plus capables de former la jonction mobile ni de sécréter les protéines de rhoptries (Kessler, Herm-Gotz et al. 2008).

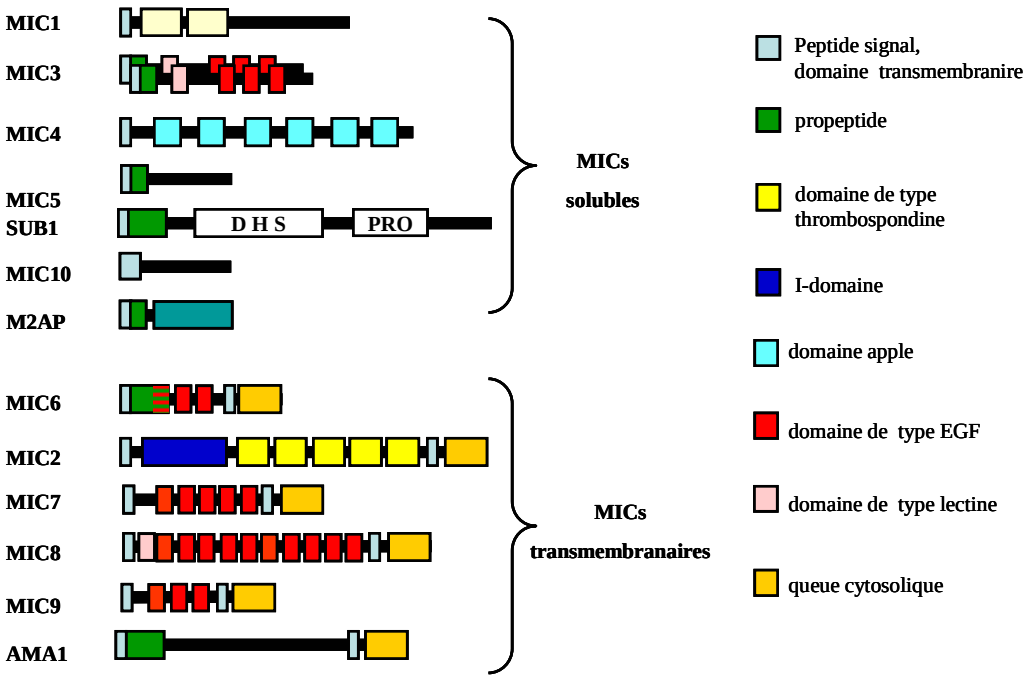


Figure 10: Illustration schématique des protéines de micronèmes solubles et transmembranaires de *T. gondii*. (UMR483)

b- Autres protéines impliquées dans l'attachement

De par leur localisation, à l'interface directe formée par le parasite et la cellule hôte, les protéines de surface sont toutes désignées pour participer à la reconnaissance et l'attachement du parasite à la cellule hôte.

Les protéines de surface de *T. gondii* sont majoritairement des protéines ancrées par l'intermédiaire d'un groupement glycosyl-phosphatidyl-inositol (GPI). Deux grandes familles géniques de ces antigènes de surface ont été définies par les homologies soit pour SAG1 ou pour SAG2 (Manger, Hehl et al. 1998; Lekutis, Ferguson et al. 2000). Certaines de ces protéines sont exprimées uniquement au stade tachyzoïte (SAG1 ou SAG2A par exemple), d'autres au stade bradyzoïte (pour exemple SAG4) ou exprimées par tous les stades invasifs comme SAG3. La fonction de ces nombreuses protéines de surface n'est pas encore très bien connue. La protéine majeure de surface SAG1 est impliquée dans l'attachement et l'invasion du tachyzoïte (Mineo, Mc Leod, 1993). La configuration homodimérique de SAG1 présente une niche chargée positivement à l'interface du dimère et pourrait potentiellement servir de site de liaison à des protéoglycanes sulfatés (He,

Grigg et al. 2002). Néanmoins, des parasites mutants dépourvus de SAG1, obtenus par génétique reverse, présentent une capacité à envahir des cellules hôtes supérieure d'au moins deux fois par rapport à la souche parentale ou au mutant recomplémenté. Malgré cet avantage de croissance *in vitro*, les parasites sont moins virulents chez la souris. Cette diminution de virulence n'est pas due à l'incapacité du mutant de se disséminer dans l'organisme, la charge parasitaire étant supérieure à celle de la souche parentale (Lekutis, Ferguson et al. 2001). SAG1 serait en partie responsable du développement de l'immunopathologie qui accompagne une infection (Rachinel, Buzoni-Gatel et al. 2004). Des parasites mutants dépourvus de SAG3 qui est exprimée par tous les stades invasifs, obtenus par génétique reverse, sont 500 à 1000 fois moins virulents pour la souris. Leur capacité d'attachement et d'invasion de cellules *in vitro* est inférieure de moitié à celle de la souche parentale (Dzierszinski, Mortuaire et al. 2000).

VI-3- Jonction mobile

Au point de contact entre la cellule et le conoïde en position étendue, se forme une petite dépression de la membrane plasmique de la cellule hôte qui se transforme en calotte sphérique, puis en anneau faisant la jonction avec le parasite. Cette jonction mobile sert d'appui au zoïte pour glisser dans la vacuole parasitophore en formation. Bien que décrite depuis plus de 30 ans, la composition de la jonction mobile vient seulement d'être partiellement élucidée. La proéine RON4 est la première à être localisée précisément, de façon prédominante à la jonction mobile (Lebrun, Michelin et al. 2005). RON4 forme un complexe avec RON2 et une protéine de micronème AMA1 (Alexander, Mital et al. 2005). D'autres protéines du col des rhoptries ont également été identifiées comme RON5 et RON8 (communication personnelle, Maryse Lebrun).

VI-4- Formation de la vacuole parasitophore

La vacuole parasitophore se referme au niveau postérieur du parasite en une calotte sphérique postérieure. La membrane entourant le zoïte se pince et se détache du plasmalemme. Le parasite se trouve alors isolé du cytoplasme de la cellule hôte, dans une vacuole parasitophore.

Des mesures de la capacité cellulaire, dont la valeur est directement corrélée à la surface, ont montré l'absence d'augmentation significative de la surface globale cellule-vacuole au cours de l'invasion de la cellule hôte par *T. gondii*, et une diminution de

surface au moment de la fermeture de la vacuole parasitophore. Ceci suggère que la membrane de la vacuole parasitophore (MVP) correspond à l'internalisation d'une partie de la membrane de la cellule hôte (environ 70 %) (SussToby, Zimmerberg et al. 1996). Les résultats de Mordue et collaborateurs ont confirmé cette hypothèse en montrant que les lipides et les protéines à ancrage glycosyl-phosphatidyl-inositol (GPI) de la membrane de la cellule hôte sont effectivement incorporés dans la membrane de la vacuole parasitophore (Mordue, Desai et al. 1999). Par contre les protéines transmembranaires en sont exclues, dont les protéines des compartiments de la voie d'endocytose (Mordue, Desai et al. 1999). Ceci permet d'expliquer que la vacuole parasitaire ne fusionne pas avec les lysosomes et ne s'acidifie pas (Jones, Yeh et al. 1972; Sibley, Weidner et al. 1985).

D'autre part l'exocytose des rhoptries se produit au début de la formation de la vacuole parasitophore. Leur contenu est déversé directement dans le cytoplasme de la cellule hôte sous forme de vésicules (évacuoles). Les protéines des rhoptries se relocalisent au niveau de la membrane vacuolaire, du coté cytosolique de la cellule. Deux protéines ROP16 et PP2C-hn se localisent également dans le noyau de la cellule hôte. ROP2 joue un rôle majeur dans l'invasion et la multiplication du parasite, elle est impliquée dans le recrutement des mitochondries cellulaires et dans la biogénèse des rhoptries (Nakaar, Ngo et al. 2003).

VI-5- Maturation de la vacuole parasitophore

La vacuole résultante résiste à la fusion avec les compartiments de la voie d'endocytose mais par contre recrute les mitochondries et le RE de la cellule hôte. Cette association est probablement impliquée dans la survie intracellulaire du parasite, notamment pour l'acquisition d'énergie et le métabolisme des lipides.

Un réseau membranaire intravacuolaire se forme, 10 à 20 minutes après l'invasion, après l'exocytose du contenu des granules denses au niveau du pôle antérieur du parasite (Dubremetz, Achbarou et al. 1993). L'observation microscopique de la continuité de la membrane de la vacuole et des tubules du réseau suggère un contact de l'intérieur de ces tubules avec le cytoplasme de la cellule hôte (Sibley, Niesman et al. 1995). Les protéines de granules dense sont sécrétées sous une forme soluble pour la majeure partie d'entre elles puis viennent se localiser à un endroit précis de la vacuole. GRA1 vient se localiser,

par une interaction faible, au niveau du réseau tubulaire intravacuolaire (Sibley, Niesman et al. 1995). Les protéines GRA4 et GRA6 interagissent spécifiquement avec GRA2 pour former un complexe multimérique qui est associé de façon stable avec le réseau intravacuolaire par des interactions hydrophobes (GRA2 et GRA6) ou protéine-protéine (GRA4) (Labruyere, Lingnau et al. 1999; Lecordier, Mercier et al. 1999). GRA3 est elle aussi sécrétée sous une forme soluble puis s'insère dans la membrane de la vacuole parasitophore sous une forme oligomérique (Ossorio, Dubremetz et al. 1994). GRA5, GRA7 et GRA8 sont également insérées dans la membrane de la vacuole parasitophore (Jacobs, Dubremetz et al. 1998; Lecordier, Mercier et al. 1999; Carey, Donahue et al. 2000). GRA7 est impliquée dans la séquestration des organelles d'endocytose de la cellule (Coppens, Dunn et al. 2006), sources de nutriments pour le parasite. Les NTPases, localisées dans la vacuole, jouent un rôle dans la récupération des purines de la cellule hôte, pour lesquelles *T. gondii* est auxotrophe, par hydrolyse des nucléosides triphosphates.

VII-La Toxoplasmose : Manifestations cliniques

La toxoplasmose touche un tiers de la population mondiale et couvre le monde entier. Selon les continents, 20 à plus de 80% des individus sont infectés. On observe également une différence de répartition d'un pays à un autre sur un même continent (Tableau1). Ces variations sont dues à des différences dans les habitudes alimentaires, le climat et les conditions d'hygiène. En France, le nombre des sujets séropositfs est relativement élevé (jusqu'à 75%), l'infection étant essentiellement consécutive à l'ingestion de kystes contenus dans de la viande (mouton ou porc) peu cuite. En Amérique Centrale, le nombre élevé de chats et le climat qui favorise la survie des oocystes, est à l'origine de la contamination humaine (Sukthana 2006).

La toxoplasmose s'avère être un grave problème de santé publique dans les cas de toxoplasmose congénitale et de neurotoxoplasmose chez les sujets immunodéprimés. Elle atteint tous les animaux domestiques et sauvages. *T. gondii* est reconnu comme l'une des principales causes d'avortement infectieux chez les animaux d'élevage, notamment les ovins et les caprins. Il est à l'origine de pertes économiques importantes.

Tableau 1: Taux de séropositivité au toxoplasme en Europe, en Amérique et au sud de l'Asie

Continents and countries	Year	Seropositivity (%)
Western Europe		
Austria	1998	43
Belgium	1997	50
France	2001	Up to 75
Germany	2004	26–54
Italy	2001	18–60
The Netherlands	2004	40.5
Spain	2004	28.6
Switzerland	1995	46
Scandinavia		
Denmark	1999	27.8
Finland	1995	20.3
Norway	1998	10.9
Sweden	2001	14.0–29.4
Central and Eastern Europe		
Croatia	2000	38.1
Poland	2001	46.4–58.5
Slovenia	2002	34
UK	1998	57–93
Yugoslavia	1992	23–33
The Americas		
USA	2004	16–40
Central America		
Costa Rica	1996	76
Cuba	1993	60
Mexico	2001	35
Panama	1988	90 (at 60 years of age
South America		
Argentina	2001	72
Brazil	2001	59
West Indies	1991	29.7
Southeast Asia		
Indonesia	2000	58[a]
Malaysia	2004	44.8
Thailand	1992, 1997, 2000, 2001	2.3–21.9

ratio mâle : femelle= 63:52 (d'après Sukthana 2006)

VII-1-La toxoplasmose humaine

La toxoplasmose humaine peut être acquise suite à une contamination post natale chez des sujets aussi bien immunocompétents qu'immunodéprimés.

VII-1-1- La toxoplasmose chez le sujet immunocompétent

La survenue d'une toxoplasmose est cliniquement inapparente dans environ 80% des cas y compris chez la femme enceinte non immunisée vis-à-vis de *T.gondii*. Elle peut se présenter sous différentes formes dont certaines peuvent être sévères.

a- La toxoplasmose ganglionaire : forme clinique la plus fréquente (15 à 20% des cas) caractérisée par la présence d'adénopathies, le plus souvent localisées dans la région cervicale ou occipitale n'évoluant jamais vers la suppuration. Ces symptômes peuvent persister plusieurs mois avant de régresser spontanément sans traitement (McCabe, Brooks et al. 1987).

b- La toxoplasmose oculaire : les infections oculaires ont longtemps été considérées comme exceptionnelles chez les sujets immunocompétents. Elle peuvent être contemporaines ou correspondre à une réactivation locale de kystes résiduels de la primo-infection (Couvreur and Thulliez 1996). Dans son évolution, la toxoplasmose est le plus souvent latente, malgré la persistance des kystes dans les tissus. Certains auteurs lui associent des modifications psychologiques et comportementales (Flegr, Kodym et al. 2000; Havlicek, Gasova et al. 2001; Flegr, Havlicek et al. 2002; Flegr, Preiss et al. 2003). D'autres ont proposé des associations entre toxoplasmose et maladies neurologiques ou psychiatriques chroniques, telles que la schizophrénie (Torrey and Yolken 2003).

VII-1-2- La toxoplasmose chez le sujet immunodéprimé

Chez les patients présentant un déficit très profond de l'immunité, l'hypothèse d'une dissémination hématogène faisant directement suite à l'infection a été évoqué dans quelques cas de toxoplasmoses cérébrales ou de toxoplasmoses pulmonaires (Pomeroy and Filice 1992; Rabaud, May et al. 1996; Raffi, Aboulker et al. 1997). Chez les transplantés d'organes contaminés par un greffon contenant des kystes de *T. gondii*, on observe un rejet fébrile se compliquant rapidement d'une dissémination ou d'une

focalisation cérébrale (Luft, Naot et al. 1983; Wreghitt, Hakim et al. 1989; Israelski and Remington 1993). Les formes les plus graves de toxoplasmose de l'immunodéprimé sont consécutives à la réactivation d'une infection acquise antérieurement. L'atteinte cérébrale est de loin la plus fréquente (Mele, Paterson et al. 2002).

a- La Toxoplasmose cérébrale : l'encéphalite toxoplasmique focalisée est la manifestation clinique la plus fréquente chez les malades immunodéprimés (Leport and Remington 1992; Luft, Hafner et al. 1993). Elle associe de la fièvre avec des symptômes divers tel céphalée, déficit moteur ou sensitif, troubles psychiatriques (Luft, Hafner et al. 1993; Raffi, Aboulker et al. 1997). Au niveau du cerveau, l'imagerie montre un ou plusieurs abcès (Gray, Gherardi et al. 1989).

b- La toxoplasmose oculaire : chez les sujets immunodéprimés, la localisation oculaire est la deuxième toxoplasmose, par sa fréquence, après la toxoplasmose cérébrale. Elle représente 10 à 20% des cas (Cochereau-Massin, LeHoang et al. 1992; Holland 2003; Holland 2004). Les rétinochroïdites sont plus étendues et plus hémorragiques que chez les patients immunocompétents (Kuo and Rao 1999).

La toxoplasmose pulmonaire : elle est peu fréquente mais d'une extrême gravité. Elle est observée chez des patients profondément immunodéprimés et se caractérise par une pneumopathie (Pomeroy and Filice 1992; Rabaud, May et al. 1994; Rabaud, May et al. 1996). L'évolution est fatale en quelques jours.

VII-1-3- La toxoplasmose congénitale :

La contamination du foetus par *T. gondii* implique le passage transplacentaire du parasite. Ce phénomène survient suite à la contamination de la mère lors d'une primo-infection. Les conséquences de l'infection sont variables, allant de la perte fœtale à une atteinte cérébrale sévère ou au contraire à une forme infra-clinique. Le risque de transmission du parasite augmente avec l'âge de la grossesse au moment de la contamination maternelle. A l'inverse, la gravité de l'infection fœtale évolue de façon inversement proportionnelle au stade de la grossesse. Au cours du premier trimestre de grossesse, l'infection fœtale se produit dans moins de 6% des cas mais conduit dans la majorité des cas à une forme sévère ou à une perte fœtale. A l'inverse au troisième trimestre de grossesse, le passage trans-placentaire survient dans 80% des cas et donne généralement une infection infra-clinique (Desmonts 1986; Dunn, Wallon et al. 1999)

Le diagnostique de la toxoplasmose congénitale repose sur plusieurs signes cliniques, les plus importants sont ; la rétinochoroïde, hydrocéphalie et calcifications crâniennes. Des lésions multi-viscérales sont également observées chez les fœtus infectés (Gay-Andrieu, Marty et al. 2003).

VII-2- La toxoplasmose animale :

Tous les animaux à sang chaud, mammifères et oiseaux, peuvent être infectés par le toxoplasme. Leur sensibilité varie en fonction de la dose infectante mais surtout de l'espèce. Quelque soit l'espèce animale, les manifestations pathologiques de la toxoplasmose sont comparables à celles observées chez l'homme. Chez la brebis et la chèvre, la toxoplasmose congénitale est la principale cause d'avortements (Buxton and Finlayson 1986).

Dans un troupeau indemne, la primo-infection s'accompagne d'une vague d'avortement dont les modalités varient en fonction du stade de la gestation. Les années ultérieures ne voient que des avortements sporadiques chez les agnelles car les brebis immunisées sont fertiles et mènent leur gestation à terme. Une contamination survenant au deux premiers mois de la gestation (moins de 50 jours) conduit le plus souvent à une mort fœtale. Celle-ci est suivie de résorption ou d'avortement. Si l'infection se produit entre le 70ème jours et le 90ème jours de la gestation, un certain nombre de fœtus meurent ou se momifient, d'autres peuvent survivre jusqu'à proximité du terme et être mort-nés. Enfin les autres peuvent naitre vivants mais très faibles et mourir dans les heures qui suivent la naissance. Si l'infection à lieu après 120 jours de gestation, les agneaux naissent apparamment sains et sont immunisés (Greig, Buxton et al. 1993). Le chat, hôte définitif peut également, présenter occasionnellement des troubles digestifs en relation avec la multiplication du parasite au stade asexué dans la muqueuse de l'intestin grêle (Dubey and Frenkel 1972; Peterson, Willard et al. 1991).

B- L'immunité contre *T. gondii*

Chez l'hôte immunocompétent, l'infection à *T. gondii* est contrôlée essentiellement par l'immunité à médiation cellulaire (Denkers and Gazzinelli 1998). Néanmoins, l'immunité à médiation humorale intervient également (Kang, Remington et al. 2000; Sayles, Gibson et al. 2000). Pour contrôler l'infection, les cellules T activées interviennent aussi bien à la phase aiguë qu'à la phase chronique de l'infection (Suzuki and Remington 1988; Gazzinelli, Hakim et al. 1991). Les cellules T CD8+ sont les cellules effectrices dont le rôle est de maîtriser la multiplication du parasite (Suzuki Y 1988) tandis que les cellules TCD4+ produisent de l'IFN-γ et régulent la réponse immune développée contre le parasite (Gazzinelli, Hakim et al. 1991; Gazzinelli, Xu et al. 1992). Les macrophages et les Natural killer sont la première ligne de défense contre le parasite pendant la phase aiguë de l'infection (Sher 1993 ; Gazzinelli 1993). Pendant cette phase la sécrétion de l'IL-12 par les macrophages, les neutrophiles et les cellules dendritiques permettra l'induction d'une réponse immune efficace contre le parasite assurée par la différentiation des cellules T précurseurs en cellules T helper 1 (Th1) (Gazzinelli et al 1994 ; Bliss et al 1999 (Reis e Sousa, Hieny et al. 1997). L'IL-12 est la cytokine majeure de la réponse innée, l'IFN-γ est la cytokine majeure des réponses innée et adaptative.

I- La réponse innée : première ligne de défense contre *T. gondii*

T.gondii est un parasite intracellulaire qui infecte son hôte via le tractus gastro-intestinal. Au niveau de la muqueuse intestinale, le parasite se trouve en contact avec une première barrière physique assimilée à plusieurs couches de cellules épithéliales, ce sont les entérocytes. Le parasite développe des stratégies d'adhésion et d'invasion des entérocytes qui lui permettront de traverser la barrière et de se disséminer rapidement aux divers organes, notamment par sa capacité à infecter et à se multiplier dans les cellules dendritiques, les macrophages, les leukocytes polymorphonucléaires (PMN) attirés sur le site de l'infection par les chimiokines et cytokines sécrétées par les entérocytes (Buzoni-Gatel and Werts 2006). Ces cellules s'échappent dans la circulation sanguine vers les

différents organes, ce qui permet au parasite de se disséminer dans la rate, les poumons, le foie, et de s'infiltrer dans le cerveau (Courret, Darche et *al*. 2006).

I-1- Schéma de l'immunité innée

Les macrophages et les cellules dendritiques sont directement infectés par les parasites libres ayant traversé l'épithélium ou indirectement en phagocytant les entérocytes infectés ou en apoptose. Les cellules dendritiques peuvent, comme cela a été montré pour les bactéries, capturer les pathogènes dans la lumière de l'intestin grâce à l'élongation de leurs dendrites, à travers les jonctions serrées de l'épithélium (Rescigno, Rotta et *al*. 2001). Le parasite infecte les CD des plaques de payer, de la lamina propria ainsi que ceux des ganglions mésentériques en plus des macrophages, et des entérocytes. L'infection des entérocytes, des CD et macrophages déclenche une réponse immune dirigée contre le parasite (Lieberman and Hunter 2002; Buzoni-Gatel, Schulthess et *al*. 2006). L'IL-15 produit par les entérocytes infectés et l'IL-12 produit par les CD activées stimulent l'activité des cellules T et leur différentiation en T helper de type 1 capables de sécréter l'IFN-γ (Aliberti, Jankovic et *al*. 2004). Ces cytokines activent également les Natural killer (NK), et les Natural Killer T (NKT) pour sécréter de l'IFN-γ (Korbel, Finney et *al*. 2004). L'IFN-γ déclenche l'activité microbicide et microbiostatique des macrophages, des cellules dendritiques et des entérocytes ce qui permet l'élimination du parasite.

Cependant, la production de l'IFN-γ incontrôlée induit une inflammation aiguë, ce qui conduit à des dommages intestinaux dus à l'infiltration des cellules immunitaires inflammatoires ainsi que des hémorragies dont la conséquence est la destruction de la barrière épithéliale. A titre d'exemple, les souris C57BL/6 infectées par voie orale avec des kystes de *T. gondii* meurent dans les 7 à 10 jours qui suivent l'infection suite à une inflammation aiguë de leur ileum plutôt que par la dissémination du parasite. Inversement les souris CBA/J, génétiquement différentes des premières, régulent leur réponse immune au niveau des intestins, elles meurent un mois après l'infection suite à une toxoplasmaose cérébrale (Liesenfeld, Kosek et *al*. 1996).

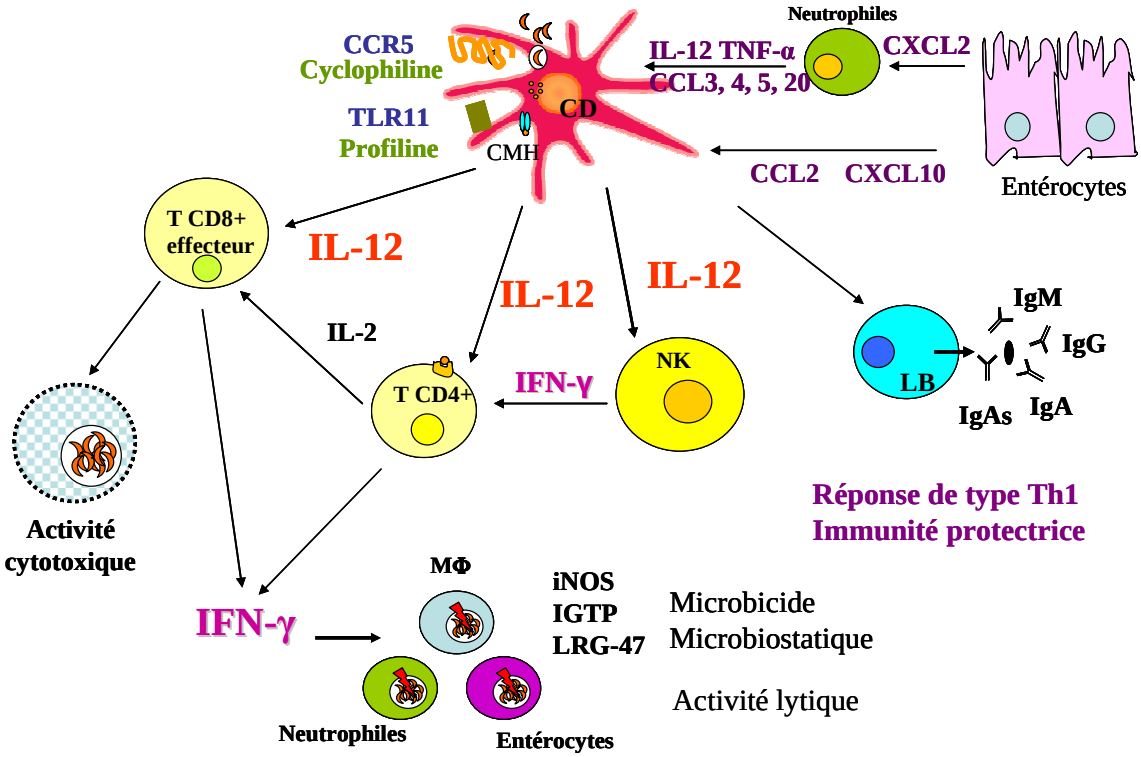


Fig11: Schéma représentatif de l'immunité anti-toxoplasmique, humorale et cellulaire, locale et systémique.

I-2- Rôle des entérocytes dans l'immunité innée contre *T. gondii*

Les entérocytes infectés produisent du NO (monoxide d'azote), des chimiokines (CCL2, CXCL10 et dans une moindre mesure : CXCL2, CCL3, CCL4 et CCL5) et de l'IL-15. Le NO limite la réplication du parasite. Les chimiokines attirent les polynucléaires (PMN), les macrophages, les cellules dendritiques sur le lieu de l'infection. L'IL-15 active les celllules NKT, cellules productrices d'IFN-γ qui activeront via une réaction en chaîne les lymphocytes T de la lamina propria (Buzoni-Gatel, Schulthess et al. 2006).

I-3- Rôle des neutrophiles, cellules dendritiques, macrophages et des Natural killer dans l'immunité innée contre *T. gondii*.

Pendant l'infection, l'IL-12 est produit par les neutrophiles, les macrophages et essentiellement par les cellules dendritiques (Denkers 2003; Liu, Fan et al. 2006).

I-3-1- Les Neutrophiles

La chimiokine CXCL2 produite par les entérocytes permet le recrutement massif des neutrophiles via leur récepteur CXCR1 murin ou CXCR2 humain (Del Rio, Bennouna et al. 2001). L'IL-17 est également impliquée dans le recrutement des neutrophiles (Kelly, Kolls et al. 2005). Les neutrophiles sont des cellules phagocytaires capables de détruire les tachyzoïtes à la fois dans leur compartiment intracellulaire mais également par la sécrétion de facteurs microbicides (Thorn, 1983, Nichols, 1985). En réponse à cette stimulation, les neutrophiles sécrètent un panel de chimiokines incluant le CCL-3, CCL4, CCL5 (RANTES) et CCL20. Ces chimiokines possèdent des propriétés attractrices pour les cellules dendritiques. Les neutrophiles sécrètent également l'IL-12 et le TNF-α, cytokines responsables de l'activation des CD. Les neutrophiles apparaissent comme les cellules responsables du recrutement et de la maturation des CD, contribuant ainsi à la génération d'une réponse adaptative de type Th1 conduisant à l'élimination du parasite (Bennouna, Bliss et al. 2003).

I-3-2- Les Cellules dendritiques

Les CD CD8+ sont probablement la source majeure d'IL-12. Cinq jours après une infection par voie orale, la plupart des CD de la lamina propria sont matures (expressions de CD40, CD80, CD86 et MHC II augmentées) (Schulthess, Fourreau et al. 2008). La stimulation de ces CD requiert l'interaction entre la molécule de co-stimulation CD154 et son ligand CD40 (Seguin and Kasper 1999; Schulz, Edwards et al. 2000).

Ces CD de par leur sécrétion d'IL-12 (mais aussi d'IL-15), activent les NK, les NKT et les cellules T CD4+. Ces cellules après activation sécrètent de grande quantité d'IFN-γ qui active les fonctions microbicides des entérocytes, des macrophages et des CD. Les CD murines activées par l'INF-γ inhibent *T. gondii* par l'induction de ROIs (Aline, Bout et al. 2002). Les CD de par leur capacité à migrer vers les tissus lymphoïdes et à présenter les antigènes aux cellules T naïves, jouent un rôle majeur dans l'initiation de la réponse immune adaptative.

Récemment, Pepper et *al* (2008), ont analysé par l'utilisation de différents marqueurs les populations de CD impliquées dans la réponse immune dirigée contre *T. gondii*, suite à une infection expérimentale par voie intra-péritonéale. De cette étude il ressort que non seulement les CD conventionnelles (lymphoïdes et myeloïdes) sont activées mais aussi les CD plasmacytoïdes. Ces auteurs indiquent par ailleurs que des résultats comparables ont été obtenu après infection par voie orale avec une souche de type II (résultats non montrés). De plus ces cellules sont capables d'activer les cellules T CD4+ naïves (Pepper, Dzierszinski et al. 2008). Les CD activées par l'IL-12 produisent de l'IFN-γ, cette production est dépendante de la molécule de transduction STAT4 (Fukao, Frucht et al, 2001).

I-3-3- les Macrophages

Les macrophages sont capables de tuer *T. gondii* dans leur compartiment intracellulaire, consécutif à une endocytose active et de libérer des facteurs microbicides en réponse à l'infection par le parasite (Murray, Rubin et al. 1985). Les macrophages Gr1+ CD68+ produisent de l'IL-12p40 et les macrophages activés par l'IFN-γ génèrent des dérivés nitrogènes pendant la phase aiguë de l'infection, inhibant ainsi la multiplication des tachyzoïtes *in vivo* (Mordue and Sibley 2003).

I-3-4- Les Natural Killer

L'IL-1β, le TNF-α et l'IL-15, également produits par les macrophages infectés, potentialisent l'effet de l'IL-12 sur l'activation des cellules NK (Gazzinelli, Hieny et al. 1993; Hunter, Abrams et al. 1993; Sher, Oswald et al. 1993; Hunter, Subauste et al. 1994; Hunter, Chizzonite et al. 1995; Hunter, Ellis-Neyer et al. 1997) tandis que le TGF-β, produit par les macrophages, semble contre-réguler ce mécanisme de protection chez les souris SCID (Hunter, Bermudez et al. 1995). En effet, le TGF-β inhibe la production d'IL-12, diminuant ainsi la stimulation de la synthèse d'IFN-γ et la prolifération des cellules T et NK (Pardoux, Asselin-Paturel et al. 1997).

L'activité cytotoxique des NK est augmentée par l'IL-18 produit par les macrophages et les CD et leur prolifération dépend de l'action concertée de l'IL-18 et de l'IL-15. La production d'IFN-γ par les NK est stimulée par l'IL-12 produit par les neutrophiles, les macrophages et les CD (French, Holroyd et al. 2006). L'intéraction directe entre les CD et les NK augmente la production d'IFN-γ par les NK ainsi que la production d'IL-12 par les CD (Guan, Moretto et al. 2007). Les NK jouent également un rôle dans la réponse adaptative. En effet, la neutralisation du récepteur NKG2D ou la déplétion des cellules NK diminue la réponse cellulaire à la fois des cellules T CD4+ et T CD8+ (Combe, Curiel et al. 2005; Guan, Moretto et al. 2007).

I-4- Rôle majeur de l'IFN-γ dans la réponse innée

Les souris IFN-γ KO succombent rapidement à l'infection, malgré la production d'IL-12 et cette mortalité est associée à une multiplication non contrôlée du parasite (Yap and Sher 1999). L'IL-12 secrété pendant la phase de l'immunité innée par les neutrophiles, les cellules dendritiques et les monocytes recrutés au niveau du site d'infection stimulent les NK à produire l'IFN-γ. L'IFN-γ déclenche d'une part l'activité microbicide et microbiostatique de nombreuses cellules dont les macrophages, entérocytes et cellules dendritiques par l'induction d'enzymes STAT1-dépendantes telles: l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS), la GTPase interféron inductible (la IGTP) et l'indolamine dioxygenase (IDO) (Yap, Shaw et al. 2006). D'autre part, l'IFN-γ induit l'expression de nombreux gènes impliqués dans l'activation et la maturation des cellules immunes (Boehm, Klamp et al. 1997).

L'importance de la sécrétion précoce de l'IFN'γ par les NK a fait l'objet de plusieurs travaux. Des expériences de déplétion de L'IFN-γ *in vivo* mettent en évidence l'importance de cette cytokine pour la mise en place d'une réponse innée au cours de l'infection à *T. gondii*. (Gazzinelli, Xu et al. 1992). Il en résulte que la déplétion de l'IFN-γ (de même que l'IL-12) conduit à la mort rapide des BALB/c suite à leur infection par la souche RH de *T. gondii*. (Nguyen, Bigaignon et al. 2003). Un résultat comparable est observé chez les souris IFN-γ KO qui succombent rapidement à la phase aiguë de la maladie (Scharton-Kersten, Wynn et al. 1996). L'IFN-γ sécrété par les NK est essentiel à l'activation des lymphocytes T, dont le rôle est primordial pour la mise en place d'une réponse adaptative anti-toxoplasme. Combe *et al* ont montré que la déplétion des NK inhibe la réponse des lymphocytes T CD8+ (LT CD8+) chez les C57/BL6 LT $CD4^{-/-}$ et que la déplétion de l'IL-12 chez ces souris est à l'origine de la réduction de la population cellulaire des NK et de la régulation négative de la réponse cellulaire médiée par les LT CD8+ (Combe, Curiel et al. 2005).

I-4-1- Le NO et le toxoplasme

L'oxyde nitrique est produit par la NO synthase (NOS), il est synthétisé par de nombreuses cellules du système immunitaire tels les macrophages, les lymphocytes T, les APC, les neutrophiles et les NK (Coleman 2001). L'isoenzyme NOS-2 (ou iNOS) est activée en réponse aux cytokines telles l'IFN-γ, le TNF et l'IL-1β pour produire des concentrations importantes d'oxyde nitrique. Ce schéma de réaction est mis en place en réponse aux infections parasitaires (Brunet 2001). *In vitro*, les cellules microgliales murines activées inhibent la réplication du parasite via la production de NO, cependant les cellules microgliales humaines, qui inhibent également le parasite, n'utilisent pas ce mécanisme ; Néanmoins, ce mécanisme est utilisé par les astrocytes humains activés par l'IFN-γ et l'IL-1β (Chao, Anderson et al. 1993; Chao, Gekker et al. 1994). Pour cerner le rôle du NO lors de la mise en place d'un système de défense par l'hôte contre le toxoplasme, des études avec des inhibiteurs de iNOS ou des souris iNOS KO ont été menées. Des souris traitées avec un inhibiteur de la synthase iNOS ou encore des souris iNOS-/- ayant perdu leur capacité à produire du NO présentent une charge parasitaire, lors de la phase chronique de l'infection, plus élevée que les C57BL/6 contrôles (Khan, Schwartzman et al. 1997). Le NO joue un rôle dans la conversion du parasite d'un stade de multiplication rapide, les tachyzoïtes, à un stade de multiplication lente, les bradyzoïtes

qui s'enkystent et persistent sous cette forme latente au niveau de divers tissus de l'hôte (Bohne, Heesemann et al. 1994).

La souche murine C57BL/6 très sensible à l'infection par le toxoplasme, requiert la production du NO pour lutter contre l'infection. Suite à leur traitement avec l'aminoguanidine un inhibiteur de iNOS, ces souris présentent une sensibilité supérieure à la normale après infection, avec une diminution des taux de NO et d'IFN-γ corrélée à une augmentation de la charge parasitaire. Il semble que chez la souche C57BL/6, le NO module la production de l'IFN-γ (Kang, Lee et al. 2004). Cependant, le même traitement soumis à des souris BALB/c naturellement résistantes n'a d'effet ni sur la production des cytokines ni sur leur résistance à l'infection (Kang, Lee et al. 2004).

I-4-2- Les p47 GTPases et l'immunité innée contre le toxoplasme :

Les p47 GTPases constituent une famille de protéines de 47 à 48 kDa qui possèdent une activité GTPase et s'attachent aux divers membranes des compartiments cellulaires tel le réticulum endoplasmique ou l'appareil de Golgi (Butcher, Greene et al. 2005). Les GTPases perturbent l'intégrité des membranes cellulaires y compris celles du toxoplasme qui se trouve exposé dans le cytosol à l'activité lytique des phagosomes ce qui aboutit à sa lyse (Yap, Shaw et al. 2006). Certaines études ont montré par des expériences *in vivo* que se sont les GTPases IGTP et LRG-47 qui sont cruciales pour la résistance à la phase aiguë de l'infection, en effet, des souris déficientes en IGTP ou en LRG-47 succombent à la phase aiguë de l'infection de la même façon que les souris déficientes en IFN-γ (Collazo, Yap et al. 2001; Butcher, Greene et al. 2005). Les astrocytes murins activés, utilisent ce mécanisme pour inhiber la réplication du parasite (Halonen, Taylor et al. 2001; Martens, Parvanova et al. 2005).

I-4-3- Les intermédiaires réactifs de l'oxygène (ROI) :

L'IFN-γ stimule les macrophages et les CD pour produire « Reactive oxygen intermediates » dont l'effet anti-microbien est un important mécanisme de l'immunité innée (Aline, Bout et al. 2002). Ces radicaux oxygénés sont instables et peuvent de ce fait réagir avec divers composants cellulaires. Cependant, l'importance de l'effet des ROI sur le toxoplasme est controversée. Alors que les macrophages humains exercent une effet microbicide sur le toxoplasme via la production des ROI (Murray, Rubin et al. 1985), le parasite semble résister aux ROI produits par les macrophages murins (Chang and Pechere 1989). En absence de ces radicaux ROI les souris sont tout à fait capables de

contrôler la dissémination du toxoplasme aussi bien pendant la phase aiguë que chronique de l'infection (Scharton-Kersten, Yap et al. 1997).

I-4-4- La privation en fer comme mécanisme de défense contre le toxoplasme

L'un des mécanismes d'action de l'IFN-γ est de limiter la disponibilité du fer au niveau des entérocytes infectés par *T. gondii* et d'inhiber de ce fait la réplication du parasite dans ces cellules (Dimier and Bout 1998).

I-4-5- Le manque de tryptophane comme mécanisme innée de lutte contre le toxoplasme :

Le tryptophane est un acide aminé essentiel au développement de *T.gondii* et le parasite le puise dans les cellules de son hôte. L'IFN-γ stimule la voie indolamine-2,3-dioxygenase qui dégrade le tryptophane inhibant ainsi la croissance du parasite, *in vitro* dans divers types cellulaires (fibroblastes et cellules épithéliales de divers espèces y compris les espèces humaines et murines) (Miller, Boulter et al. 2008). D'après Suzuki et al (2007), ce mécanisme de défense pourrait être important pour limiter le réplication du parasite au niveau intestinal lors de l'étape initiale de l'infection pourrait également freiner la migration du parasite à travers la barrière placentaire (suzuki Y 2007)

I-5- Rôle de l'IL-12 dans la réponse innée

La neutralisation de l'IL-12 augmente la sensibilité des souris à l'infection et entraîne une mortalité de 100% des souris C57BL/6, BALB/c et SCID en phase aiguë d'infection (Gazzinelli, Wysocka et al. 1994). Cette neutralisation est sans effet si elle est réalisée lors de la phase chronique de l'infection. Chez des souris BALB/c et SCID (dépourvues de lymphocytes T $CD4^+$ et $CD8^+$) infectées, la survie est prolongée par un traitement avant infection avec de l'IL-12 recombinante (Gazzinelli, Hieny et al. 1993; Hunter, Candolfi et al. 1995). Cet effet est abrogé par la neutralisation de l'IFN-γ ou du TNF-α, ou par la déplétion des cellules NK.

L'IL-12 est donc une cytokine nécessaire à l'initiation de la réponse immunitaire cellulaire et à l'induction d'une résistance, mais elle ne semblait pas requise pour le maintien de l'immunité *in vivo* (Gazzinelli, Hieny et al. 1993). Néanmoins, les travaux de Yap sur des souris déficientes en IL-12, ont montré qu'en absence d'un traitement par de l'IL-12 après la phase aiguë, les souris meurent de toxoplasmose cérébrale. Le maintien

d'une résistance préétablie requiert donc la présence continue d'IL-12 (Yap, Pesin et al. 2000).

Deux voies sont impliquées lors de la synthèse de l'IL-12 suite à une infection par *T.gondii* : une première voie MyD88 dépendante (Scanga, Aliberti et al. 2002) et une seconde voie impliquant le récepteur CCR-5 (Aliberti, Reis e Sousa et al. 2000).

Les souris MyD88 KO ne contrôlent pas l'infection et succombent à l'infection par une souche avirulente de type II, que ce soit après inoculation par voie intrapéritonéale ou orale (Scanga, Aliberti et al. 2002; Sukhumavasi, Egan et al. 2008). Chez ces souris une diminution très importante de l'IL-12 est observée *in vivo* dans le sang après infection et *in vitro*, après stimulation avec des antigènes parasitaires, les macrophages, CD et neutrophiles issus des souris MyD88 KO produisent très peu d'IL-12. L'observation que la production d'IL-12 n'est pas complètement abolie chez les souris MyD88 KO, suggère l'existence d'une ou d'autres voies, indépendante(s) de la voie de signalisation MyD88. c'est seulement après le traitement des souris MyD88 KO avec la toxine de Pertussis qui interfère avec la voie de signalisation impliquant la protéine G (voie de signalisation utilisée par CCR5) que la production d'IL-12 est complètement abolie (Alfano, Schmidtmayerova et al. 1999) (Scanga, Aliberti et al. 2002). Ces résultats, confirment ceux de Aliberti et *al* qui ont montré que la liaison de la cyclophiline-18 de *T.gondii* au récepteur CCR5 active les CD et induit la production d'IL-12(Aliberti, Reis e Sousa et al. 2000; Aliberti, Valenzuela et al. 2003).

MyD88 est une molécule adaptatrice, initiant les voies de signalisation de la plupart des TLRs et des récepteurs IL-1 et IL-18. Le fait que les souris $ICE^{-/-}$ (IL-1 et Il-8 non fonctionnelles), ne sont pas plus sensibles à une infection que les souris sauvages indique que MyD88 est essentiellement impliquée dans la voie de signalisation des TLR (Hitziger, Dellacasa et al. 2005).

Sukhumavasi et *al* (2008) ont montré que quatre jours après l'infection par voie orale (voie naturelle) avec la souche ME49 de type II, les souris MyD88 KO montrent nettement moins de neutrophiles recrutés et de p47 GTPase induite au niveau de la muqueuse intestinale que les souris sauvages. C'est à partir du septième jour après l'infection que les souris MyD88 KO montrent un profil de recrutement de neutrophiles et une induction de p47 GTPase comparables à celle des souris sauvages. Les CD4+ des souris MyD88 KO sécrètent normalement de l'IFN-γ malgré l'absence de l'IL-12. Cependant, malgré la mise en place de cette immunité, les souris KO meurent deux semaines après infection (Sukhumavasi, Egan et al. 2008).

Par ailleurs, des différences ont été observées quant à l'importance relative des voies de signalisation MyD88 dépendante ou MyD88 indépendante, en fonction du type de la souche infectante, type I versus type II. *In vitro*, les macrophages des souris infectées par des souches de type II produisent plus d'IL-12 que ceux des souris infectées par les souches de type I (Robben, Mordue et al. 2004; Kim, Butcher et al. 2006). Ces observations sont à rapprocher du fait que les souches de type I expriment une protéine ROP16 qui agit indirectement sur l'état de phosphorylation de STAT3/6, et qui a pour effet une diminution de la sécrétion d'IL-12 par les macrophages infectés.

Kim et *al* ont montré que des macrophages MyD88 KO montrent une importante réduction dans leur production de l'IL-12 suite à leur infection par la souche atténué Me49 de type II tandis que les macrophages MyD88 KO infectés par la souche RH de type I ne perdent pas leur capacité à sécréter cette cytokine *in vitro*. Il semblerait que la souche RH empreinte une voie majoritairement MyD88 indépendante pour induire l'activation des macrophages et la sécrétion de l'IL-12 contrairement à la souche ME49 qui est plus largement MyD88 dépendante (Kim, Butcher et al. 2006). *In vivo*, les souris MyD88 KO, infectées avec la souche RH, produisent de l'Il-12 dans leur sérum, à un niveau cependant moindre que les souris sauvages, suggérant l'implication des voies MyD88 dépendante et indépendante. Pour l'analyse de la résistance à l'infection, la souche RH étant létale pour les souris y compris sauvages, Kim et al (2006) ont infecté des souris MyD88 KO et IL-12 KO avec une souche de type I atténuée, la souche ts4. Dans leurs conditions expérimentales, les souris MyD88 KO survivent à l'infection par la souche ts4 alors que les souris IL-12 KO meurent et les souris MyD88 KO meurent suite à une infection avec la souche Me49 de type II. Ces résultats suggèrent que la voie de signalisation indépendante de MyD88 pour l'induction de l'IL-12, permet aux souris de survivre à une infection (Kim, Butcher et al. 2006). Ces résultats sont à rapprocher de ceux de Sukhumavasi et al (2008), qui ont montré que les souris MyD88 infectées avec une souche atténuée de type I, auxotrophe pour l'uracile, peuvent développer une réponse immune adaptatrice protectrice contre une épreuve par voie intrapéritonéale avec la souche RH ou par voie orale avec la souche Me49. Parallèlement, les souris IL-12 KO ne sont pas capables de développer une réponse immune protectrice.

I-6- La famille des Toll like recepteurs et *T. gondii*

L'activation de la réponse immunitaire innée est initiée par la reconnaissance de PAMPs (pathogen associated molecular pattern) par les PRR (patterns recognition receptors). Les PRR sont groupés en quatre familles : la famille des TLR récepteurs (Toll-like récepteurs), la famille des NOD récepteurs (nucleotide-binding oligomerzation domain), la famille RLR (RIG-like RNA hélicase) et la famille des lectines.

I-6-1- Les TLRs et leurs Voies de signalisation.

Les **TLRs** (Toll-like receptors) appartiennent à la grande famille des PRRs **(**Pattern-Recognition Receptors). En tant que tels, ils interviennent au cours des mécanismes de l'immunité innée en reconnaissant des motifs moléculaires conservés chez les pathogènes, appelés PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Patterns). Ces motifs sont de divers origine (bactérie, virus, parasite) et de nature variée (protéine, ose, acide nucléique). Les TLRs et plus généralement les PRRs sont présents à la surface de la membrane cellulaire ou de la membrane endosomale de différentes cellules du système immunitaire tel les phagocytes polymorphonucléaires (PMN), les monocytes/macrophages, les cellules dendritiques, les natural killer, ainsi qu'au niveau des cellules épithéliales et endothéliales de la muqueuse. La signalisation via les TLR vise à activer le facteur de transcription NF-κB impliqué dans la production de cytokines pro-inflammatoires. (Zhang and Ghosh 2001).

Les récepteurs Toll ont été décrits pour la première fois chez la drosophile comme une protéine transmembranaire intervenant lors du développement embryonnaire. Cette protéine présente une forte homologie de séquence avec IL-1 récepteur humain, du fait de cette similarité structurale, les TLRs ont été classé comme appartenant à la superfamille des Toll/IL-1 récepteurs (TIR), les récepteurs appartenant à cette famille présentent un domaine intracellulaire TIR (Fig9)

A ce jour 13 TLRs ont été décrits chez la souris, chez l'homme 10 TLRs ont été identifiés les TLRs 1, 2, 4, 5, 6 sont rencontrés au niveau de la membrane plasmique, tandis que les TLRs 3, 7, 8, 9 sont intracellulaires localisés au niveau de la membrane des endosomes (Tableau 2)

Les voies de signalisation activées par les TLRs sont classées en deux catégories : la voie MyD88-dépendante et la voie MyD88-indépendante.

Quatre molécules adaptatrices cytosoliques sont impliquées dans la signalisation via les TLRs :

- MyD88 (myeloid differentiation primary response gene 88) recrutée par tous les TLRs à l'exception du TLR-3.
- MAL connue aussi sous le nom de TIRAP, molécule recrutée par les TLR-2 et 4
- TRIF connu aussi sous le nom de TICAM1, est utilisée par les TLR-3 et 4
- TRAM, connue aussi par TICAM2, est utilisée par le TLR-4 (Krishnan, Selvarajoo et al. 2007).

Les TLRs (sauf le TLR3) utilisent la voie MyD88 pour la signalisation cellulaire. L'activation de cette voie déclenche une cascade de réactions qui aboutie à l'activation du facteur de transcription NF-κB, ce qui permet la synthèse de l'IL-12 ainsi que des cytokines pro-inflammatoires.

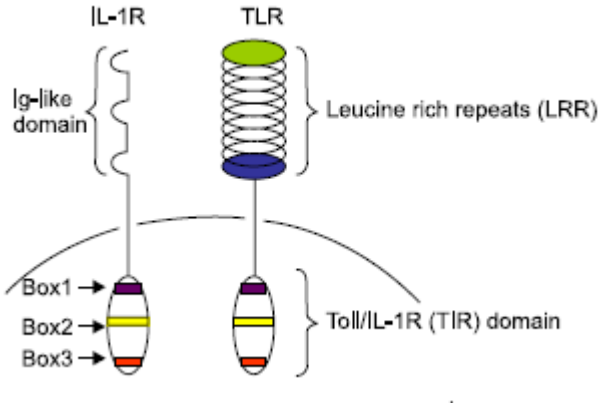


Fig12 : Les TLR sont des protéines transmembranaires de type I comportant :
un domaine extracellulaire récepteur du signal de danger et composé de nombreux motifs LRRs (Leucin-Rich Repeats), un domaine transmembranaire, un domaine intracellulaire (TIR) de 160 acides aminés commun avec l-IL-1R, essentiel à la signalisation cellulaire. Ce dernier domaine contient 3 régions appelées Box1, Box2, Box3 dont les séquences sont homologues à celle du IL-1R et qui permettent la transduction du signal d'activation (Krishnan, Selvarajoo et al. 2007). Le domaine TIR possède un résidu proline spécifique indispensable pour la fonction de signalisation de la plupart des TLRs. Le changement de cette proline par un autre acide aminé fait perdre aux TLRs leur capacité à activer le NF-κB (Zhang et al. 2004).

Tableau 2 : TLR et leurs ligands (d'après Krishan et *al*, 2007)

TLRs	Adapters	Location	Species	Ligands
TLR1	MyD88/Mal	Cell surface	Human/Mouse	PAM3CSK4
TLR2	MyD88/Mal	Cell surface	Human/Mouse	PAM2CSK4, MALP2, LTA, ZYM
TLR3	TRIF	Cell compartment	Human/Mouse	dsRNA, Poly-IC, viral RNA, siRNA, endogenous mRNA
TLR4	MyD88/Mal/TRIP/TRAM	Cell surface	Human/Mouse	LPS, MMTV, VSV-G, Taxol, F protein, Fibronectin, HSP60, HSP70, Hyaluronan
TLR5	MyD88	Cell surface	Human/Mouse	Flagellins
TLR6	MyD88/Mal	Cell surface	Human/Mouse	MALP2, LTA, Zym
TLR7	MyD88	Cell compartment	Human/Mouse	ssRNA, IAQ (R848)
TLR8	MyD88	Cell compartment	Human/Mouse	ssRNA, IAQ (R848)
TLR9	MyD88	Cell compartment	Human/Mouse	CpG-ODN
TLR10	Unknown	Cell surface	Human	Unknown
TLR11	MyD88	Cell surface	Mouse	Profilin
TLR12	Unknown	Unknown	Mouse	Unknown
TLR13	Unknown	Unknown	Mouse	Unknown

CpG-ODN, synthetic oligodeoxyribonuclotides containing CpG motifs; IAQ, imidazoquinolines, including resiquimod and imiquimod; LTA, lipoteichoic acid; MAL, MyD88 adapter-like; MALP2, macrophage-activating lipopeptide 2; MMTV, mouse mammary tumor virus; PAM3CSK4, synthetic triacylated lipopeptide Pam_3Cys-SKKKK × 3 HCl; PAM2CSK4, synthetic diacylated lipopeptide Pam_2Cys-SKKKK × 3 TFA; Poly-IC, polyinosinic-polycytidylic acid; ssRNA, single stranded RNA; VSV-G, vesicular somatitis virus G protein; ZYM, zymosan.

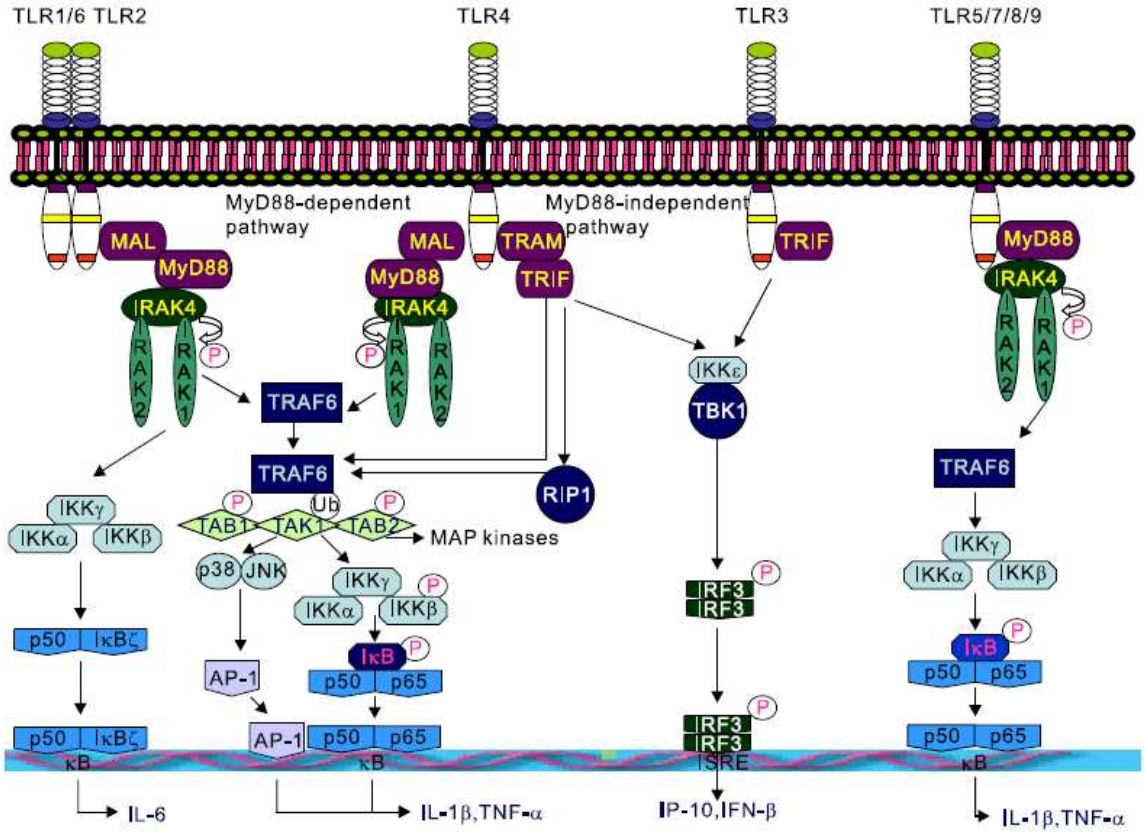


Fig13: La signalisation via les TLRs classée en MyD88dépendante et MyD88 indépendante. (d'après Krishnan et *al*, 2007)

I-6-2- Rôle des TLRs dans la reconnaissance de composants microbiens

Le TLR4

Le ligand majeur du TLR6/4 est le lipopolysaccharide (LPS), c'est un des composants de la membrane externe des bactéries Gram négatif. C'est une endotoxine capable de provoquer des chocs septiques. Le LPS est un complexe de glycolipide compose d'un domaine hydrophile, le polysaccharide et d'un domaine hydrophobe le lipide A qui est responsable de l'activité biologique du LPS. Le LBP (LPS binding protein) présent dans le sérum, se lie au LPS pour former un complexe, ce complexe interagie avec le récepteur CD14, une glycoprotéine membranaire présente à la surface des monocytes. Le CD 14 est également présent à l'état soluble dans le sérum ce qui permet aux cellules $CD14^{-}$ telles les cellules endothéliales et épithéliales de répondre au LPS.

Par ailleurs, les cellules HEK 293 (human empryonic kidney) humaines transfectées avec le TLR4 sont incapables de répondre à la stimulation par le LPS et ne présentent pas de transcription de leur facteur de transcription, le NF-κB. Ceci suggère que pour son activation le TLR4 requiert une autre molécule, cette dernière a été identifiée comme la molécule soluble MD-2 associée physiquement au TLR-4 au niveau de son domaine extracellulaire en surface cellulaire (Akira, Takeda et al. 2001). Une mutation présentée pas la lignée CHO (chinese hamster ovary cell line) abolit la capacité de la lignée à répondre à la stimulation par le LPS, la mutation en question touche la protéine MD-2 ce qui confirme l'implication de cette protéine dans la reconnaissance du LPS par le TLR-4 (Schromm, Lien et al. 2001).

Le TLR4 reconnaît également la protéine (F) du virus du syncytium respiratoire (Kurt-Jones, Popova et al. 2000), le domaine (A) de la fibronectine (Okamura, Watari et al. 2001), les heat shok protein produites par les bactéries mais aussi les mammifères avec une structure très conservée tel les HSP60 et HSP70 (Ohashi, Burkart et al. 2000)

Les TLR1, TLR2 et TLR6

Le TLR-2 reconnaît essentiellement les lipoprotéines et les glycolipides. Les lipoprotéines sont des protéines qui présentent un lipide accroché avec une liaison covalente aux cystéines de l'extrémité NH2-terminale de la protéine. Le TLR2 reconnaît une grande variété de pathogènes et de leurs composants, ceci inclut la paroi cellulaire des levures, les mycobactéries et leur lipoarabinomannan, le peptidoglycane, le

glycosylphosphatidylinositol de *Trypanosoma cruzi* et des glycolipides de *Treponena* (Akira, Takeda et al. 2001).

Cependant pour être activé, le TLR2 coopère avec d'autres TLRs notamment TLR6 et TLR1. La coopération entre les TLR2 et 6 est nécessaire à la sécrétion du TNF-α par les macrophages activés par le peptidoglycane des bactéries gram positif (Ozinsky, Underhill et al. 2000). Le domaine cytoplasmique de TLR2 s'associe fonctionnellement avec les domaines cytoplasmiques des TLR1 pour l'induction des cytokines pro-inflammatoires par les macrophages en réponse à la stimulation aux triacyl lipopeptides et lipoprotéines de mycobactéries (Alexopoulou, Thomas et al. 2002).

Le TLR5

Le TLR5 reconnaît la flagelline, c'est un monomère de 55kDa et un composant principal des flagelles de bactéries. En effet des cellules CHO transfectées avec le TLR-5 répondent à la stimulation par la flagelline par la synthèse du facteur de transcription NF-κB (Hayashi, Smith et al. 2001). Le TLR5 reconnaît aussi bien la flagelline des bactéries gram négatif que des bactéries gram positif (Akira, Takeda et al. 2001).

Les TLR3 TLR 7 et TLR8

Le TLR3 reconnaît l'ARN virale double brin. Le TLR3 est localisé au niveau des endosomes des cellules dendritique conventionnelles, l'acidification de ces endosomes permet son activation. La signalisation via TLR3 active la transcription des facteurs IRF3 (interferon regulatory factor3) et NF-κB via la molécule adaptatrice TRIF et induit l'expression de l'IFN-β. Les ARNs viraux sont de ce fait des inducteurs de l'IFN de type I. Les TLR7 et TLR8 humain sont intracellulaires, ils présentent une structure hautement conservée, et reconnaissent l'ARN simple brin viral et les composés synthétiques de la famille des imidazoquinolines à activité antivirale (Uematsu and Akira 2007).

Le TLR9

Le TLR9 reconnaît les motifs CpG des ADN bactériens hypométhylés. Le CpG DNA stimule les cellules B, les macrophages, et les DC pour la sécrétion des cytokines, spécialement les cytokines de type Th1 comme l'IL-12 et l'IL-18, les cellules activées voient augmenter l'expression de leur molécule de costimulation ainsi que leur capacité de présentation antigénique (Akira, Takeda et al. 2001).

Le TLR11

Le TLR11 est essentiel à la reconnaissance des bactéries uropathogènes (Zhang, Zhang et al. 2004) ainsi qu'à la profiline de certains apicomplexes (Yarovinsky, Zhang et al. 2005; Gowen, Smee et al. 2006). En effet des macrophages TLR11KO stimulés *in vitro* par *E. coli* 8NU, une bactérie uropathogène tuée à la chaleur, ne sont pas capables de répondre à la stimulation contrairement aux macrophages sauvages. Le TLR11 présent au niveau des reins, semble reconnaître certaines composantes de bactéries uropathogènes protégeant ainsi les reins de ces infections. En effet, l'infection massive observée au niveau des reins chez les souris TLR11 KO conforte l'hypothèse que le TLR11 joue un rôle primordial dans la prévention contre les infections dues aux bactéries uropathogènes (Zhang, Zhang et al. 2004). Des essais de stimulation de cellules dendritiques murine *in vitro* ont montré que ces cellules produisent de l'IL-12 suite à leur stimulation par l'extrait total de *T. gondii*, et sont incapables de synthétiser cette cytokine suite au traitement de l'extrait antigénique avec des protéases. Les auteurs ont identifié un ligand de TLR 11 de nature protéique qui est la profiline de *T. gondii* (Yarovinsky, Zhang et al. 2005). Cette protéine induit la sécrétion de l'IL-12 aussi bien *in vitro* par les cellules dendritiques, qu'*in vivo* suite à sa fixation au TLR11. Des souris TLR11KO présentent une forte baisse de la concentration de l'IL-12 dans leur sérum, elles montrent également une forte baisse dans la production de l'IFN-γ comparée aux souris sauvages. Par ailleurs, le rôle des profilines de divers Apicomplexess dans l'induction de l'IL-12 via la reconnaissance du TLR-11 a également été évoqué (Rosenberg, Juckett et al. 2005; Yarovinsky, Zhang et al. 2005; Plattner, Yarovinsky et al. 2008).

I-6-3- Les TLRs impliqués dans la reconnaissance de *T.gondii*

Les souris TLR1 KO, TLR2 KO, TLR4 KO, TLR6 KO, TLR9 KO infectées par voie intrapéritonéale avec une souche de type II, PTGluc (souche exprimant la luciférase, gène rapporteur permettant le suivi de la réplication du parasite *in vivo*), contrôlent l'infection aussi bien que les souris sauvages (analyse jusqu'à 10 jours après l'infection), contrairement aux souris MyD88 KO (Hitziger, Dellacasa et al. 2005). Par ailleurs, les souris TLR11 KO ne meurent pas après infection avec la souche Me49 de type II. Ces résultats indiquent clairement que la susceptibilité des souris MyD88 KO infectées par une souche de type II implique simultanément plusieurs TLRs.

Plusieurs études ont été menées afin de déterminer les récepteurs de l'immunité innée impliqués dans l'activation de la voie MyD88 en réponse à *T. gondii.* Il a été montré que le TLR-11 est le récepteur de l'immunité innée qui reconnaît la profiline du toxoplasme. Ce récepteur est requis pour la production de l'IL-12 aussi bien *in vivo* qu'*in vitro* via la molécule adaptatrice MyD88 (Yarovinsky, Zhang et al. 2005). En effet, des expériences *in vitro* ont montré que des DC de souris TLR11-/- stimulées par la profiline, par l'extrait soluble de toxoplasme ou encore par le parasite vivant ne produisaient pas de l'IL-12p40. *In vivo*, des souris TLR-11 KO infectées avec une souche non virulente de *T. gondii* présentent, au cours de la phase chronique de la maladie, une charge parasitaire cérébrale significativement plus importante que les souris sauvages (Yarovinsky, Zhang et al. 2005). Cependant, ces souris ne meurent pas, contrairement aux souris MyD88 KO suggérant la contribution d'autres TLRs dans la protection.

Le rôle fondamental du TLR-2 dans la mise en place d'une réponse immune contre une invasion parasitaire a été clairement mis en évidence lors d'infections dues à *Leishmania* ou encore à *Trypanosoma cruzi*. Cependant des études qui ont porté sur l'implication du TLR-2 dans la mise en place d'une réponse immune contre *T. gondii* ont montré que des souris TLR-2 KO présentent une sécrétion normale d'IL-12 ainsi qu'une résistance à l'infection par des doses conventionnelles de *T. gondii*. C'est uniquement suite à l'inoculation de fortes doses de *T. gondii* que les souris TLR2-/- succombent à l'infection (l'infection des souris TLR2-/- par 300 kystes entraîne 100% de mortalité en 10 jours) (Mun, Aosai et al. 2003), le TLR-2 semble jouer un rôle important lors de l'infection à hautes doses de *T. gondii*. En effet si les DC et les neutrophiles de souris TLR-2 KO semblent secréter normalement de l'IL-12 suite à l'infection par le toxoplasme, l'activation des macrophages est strictement dépendante de l'activation du TLR-2 par le parasite (Mun, Aosai et al. 2003). L'activation des macrophages via le TLR-2 entraîne la production du NO essentiel pour le contrôle de la dissémination du parasite (Scharton-Kersten, Yap et al. 1997). D'autres mécanismes effecteurs semblent dépendre de l'activation du TLR-2 tel que la production de la chimiokine CCL-2 essentielle au recrutement des neutrophiles (Del Rio, Butcher et al. 2004) ou encore la synthèse du TNF par les macrophages suite à l'activation du TLR-2 par son ligand, le core du glycane et le diacylglycerol isolés du GPI de *T.gondii* (Debierre-Grockiego, Campos et al. 2007).

En conclusion, tandis que le TLR-11 contrôle la sécrétion de l'IL-12 essentielle à la mise en place des mécanismes de défense de l'hôte, le TLR-2 semble impliqué dans la régulation de la production du CCL-2 ou du TNF en réponse au parasite (Debierre-Grockiego, Azzouz et al. 2003; Del Rio, Butcher et al. 2004; Debierre-Grockiego, Campos et al. 2007). Cependant le TLR-4 semble coopérer avec le TLR-2 pour la production du TNF (Debierre-Grockiego, Campos et al. 2007).

Le TLR-9 semble directement impliqué dans la reconnaissance du parasite par l'hôte et dans la mise en place d'une réponse cellulaire effectrice au niveau de l'intestin grêle. En effet des souris TLR-9 KO infectées par voie orale montrent une diminution de la réponse Th1 au niveau de l'intestin grêle et de la lamina propria mais sont résistantes à l'iléite due à l'infection par le toxoplasme (Minns, Menard et al. 2006). Cependant, l'utilisation *in vitro* de cellules transfectées avec TLR-9 ou des cellules déficientes en TLR-9 suggèrent que *T.gondii* n'active pas le TLR-9. La diminution de la réponse Th1 observée chez les souris TLR-9 KO pourrait être due à la diminution de l'effet adjuvant de la flore commensale intestinale dont les motifs CpG ne sont plus reconnus (Yarovinsky 2008).

I-7-La distribution cellulaire des TLRs :

I-7-1- La distribution tissulaire des TLR chez l'Homme

Plusieurs études ont traité de la répartition cellulaire des TLRs chez l'Homme et la souris. Chez l'Homme, la plupart des tissus expriment au moins un TLR, tandis que certains tissus comme ceux de la rate ou encore les leucocytes périphériques expriment tous les TLRs. Les neutrophiles expriment tous les TLR exception faite du TLR3. Les éosinophiles expriment constitutivement les TLR 1, 2, 4, 6, 7, 9 et 10. Les basophiles expriment les TLR2 et TLR4 mais pas le CD14. Les macrophages/monocytes expriment l'ARNm de tous les TLR exception faite du TLR3.

L'expression des TLRs au niveau des cellules dendritiques varie en fonction de leur sous-type (Sandor and Buc 2005). Les cellules dendritiques myéloides (mDCs) expriment les TLR 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8 mais pas les TLR7 et TLR9 qui sont exprimés par les pDC (Jarrossay, Napolitani et al. 2001; Yarovinsky, Zhang et al. 2005). A la rencontre des

différents composés microbiens, les DC entrent en maturation ce qui module l'expression de leur TLR. L'expression des TLR 1, 2, 4, 5 diminue chez les DC matures (Sandor and Buc 2005) tandis que le TLR3 est exprimé uniquement par les DC matures. Les cellules B expriment fortement les TLR 1, 6, 9 et 10 mais faiblement les TLR 2, 4 et 7. Les NK qui jouent un rôle majeur dans l'immunité anti-virale expriment le TLR 3.

Les TLR sont aussi exprimés au niveau de la peau et des cellules épithéliales de diverses muqueuses. Les kératinocytes expriment les TLR 1 à 5 mais pas les TLR 6, 7, 8 et 10. Les TLR2 et 4 ont été détectés au niveau de la muqueuse nasale et des amygdales. Toujours chez l'homme, le TLR2 est également exprimé au niveau des cellules épithéliales alvéolaires et des cellules épithéliales basales des voies respiratoires, tandis que le TLR4 est exprimé au niveau des poumons. Les TLR2 et 4 sont également exprimés au niveau des reins. Au niveau intestinal, le TLR5 est exprimé sur la surface basolatérale des cellules épithéliales des intestins mais pas sur leur surface apicale ce qui évite une constante activation par la flore microbienne (Sandor and Buc 2005). Les TLR 1, 2, 3, 5 ,6 sont exprimé au niveau de la muqueuse vaginale chez l'Homme mais pas le TLR4 et la molécule MD2 ce qui explique que ces cellules ne répondent pas à la stimulation par le LPS (Fichorova, Cronin et al. 2002). Chez l'Homme, le TLR11 serait un pseudogène. La phase de lecture ouverte du TLR11 humain contient des codons stop (Zhang, Zhang et al. 2004).

I-7-2- La distribution tissulaire du TLR11 murin

Chez la souris, les cellules épithéliales utérines et vaginales expriment les TLR1 à 9 (Yao, Fernandez et al. 2007). Le TLR11 a été cloné et décrit par Zhang et *al* (2004), il reconnaît certaines composantes bactériennes de bactéries uropathogènes, ainsi que la profiline-like de *T.gondii* (Zhang, Zhang et al. 2004; Yarovinsky, Zhang et al. 2005). Zhang et *al*. (2004) ont montré que le TLR11 est fortement exprimé au niveau des cellules épithéliales des reins et de la vessie, et moins fortement au niveau des cellules épithéliales du foie, cependant il est faiblement exprimé au niveau de la rate. Le TLR-11 est également exprimé au niveau de certaines cellules du sang tel que les macrophages (Zhang, Zhang et al. 2004; Yarovinsky, Zhang et al. 2005). D'autres cellules présentatrices d'antigènes, particulièrement les cellules dendritiques dérivées des DC CD8α+ telles que les lymphoides et les plasmacytoides semblent exprimer le TLR11

également (Yarovinsky, Zhang et al. 2005; Pepper, Dzierszinski et al. 2008). Au niveau du site muqueux, le TLR11 est rencontré au niveau de la muqueuse vaginale sur les cellules épithéliales de souris (Yao, Fernandez et al. 2007).

Tandis que chez l'Homme, le TLR11 serait un pseudogène (Zhang, Zhang et al. 2004), il semblerait que chez la souris les TLR11 et 12 seraient un même TLR (Temperley, Berlin et al. 2008).

I-8- La subversion du système immunitaire innée par *T. gondii*

Les parasites intracellulaires en règle générale et *T. gondii* en particulier résistent à l'activité enzymatique des lysosomes, et inhibent l'acidification du phagosome. Ce parasite inerfère également dans la signalisation cellulaire de l'hôte ce qui lui permet de manipuler les cellules qu'il infecte (Sacks and Sher 2002). Il diminue également la signalisation cellulaire responsable du phénomène d'apoptose, prolongeant ainsi la vie de la cellule hôte et donc sa propre survie (Luder, Gross et al. 2001).

L'entrée du toxoplasme dans les cellules phagocytaires tels que les macrophages peut se faire soit par pénétration active, soit par phagocytose. Lorsque le parasite envahit de façon active un macrophage, il pénètre dans la cellule par son pôle apical, et s'entoure d'une vacuole parasitophore, dans laquelle il se multiplie après l'avoir modifiée (Morisaki, Heuser et al. 1995; Mordue and Sibley 1997). Cette vacuole ne fusionne avec aucun des compartiments de la voie d'endocytose (Mordue, Hakansson et al. 1999). Lorsque le parasite est opsonisé ou affaibli, il est phagocyté par les macrophages. Dans ce cas, le processus d'entrée ne nécessite pas une orientation particulière du parasite par rapport à la cellule et, ne fait pas intervenir l'exocytose du contenu des organites apicaux. La vacuole entourant le parasite est un phagosome classique qui acquiert rapidement les marqueurs de la voie d'endocytose et fusionne avec les lysosomes. Le parasite est alors détruit sous l'action des enzymes lysosomiaux (Morisaki, Heuser et al. 1995; Mordue and Sibley 1997).

Le parasite est capable également d'interférer avec la voie d'activation du NF-κB dans les macrophages murins. L'HSP 70 des souches virulente (typeI) a été impliquée dans la diminution de l'expression de la iNOS, expression dépendante de la voie d'activation du NF-kB (Dobbin, Smith et al. 2002).

T. gondii diminue l'expression, des molécules de CMHII IFN-γ dépendante, des macrophages, des cellules dendritiques et des cellules présentatrices du cerveau selon un ou des mécanismes non complètement élucidés. (Luder, Lang et al. 1998; Luder, Lang et al. 2003; McKee, Dzierszinski et al. 2004), *T.gondii* pourrait interférer sur la liaison de STAT1α avec sa séquence consensus GAS (gamma activated site) et/ou sur les promoteurs de IRF-1 et CIITA, gènes dont l'expression est induite, en réponse à l'IFN-γ (Lang et *al* 2006) .

La production de l'IL-12 par les macrophages ainsi que les fonctions effectrices sont modulés sous l'effet des cytokines IL-10 et TGF-β dont la sécrétion est stimulée par le parasite (Sacks and Sher 2002). Les lymphocytes intra épithéliaux présentent une activité cytotoxique via à vis des entérocytes infectés, ils sécrètent du TGF-β qui limite la production de l'IFN-γ (Buzoni-Gatel and Werts 2006). Ils secrètent également de l'IL-10 en activant la voie de STAT-3 impliquée dans la modulation de la maladie de bowel (Gordon, Di Sabatino et al. 2005). Ce contrôle de l'expression de l'IL-12 est bénéfique aussi bien pour le parasite que pour l'hôte, puisque des souris déficientes en IL-10 présentent une production d'IL-12 excessive qui endommage leur tissus malgré la baisse de leur charge parasitaire (Gazzinelli, Wysocka et al. 1996; Neyer, Grunig et al. 1997). L'action du TGF-β est comparable à celle de l'IL-10 puisque le traitement anti-TGF-β induit une infection létale due à l'hyperproduction des cytokines pro-inflammatoires (Omer, Kurtzhals et al. 2000).

L'étude des mécanismes par lesquels le parasite contrôle la secrétion de l'IL-12 par les DC a montré que les DC de souris immunisées par de l'antigène total de *T. gondii* sécrètent brièvement de l'IL-12 et restent réfractères à une seconde immunisation pendant une semaine. Cette inhibition de la sécrétion de l'IL-12 n'est pas due à la sécrétion de l'IL-10 mais semble dépendre de l'induction par *T. gondii* de la lipoxine A4 (LXA4) un produit du métabolisme de l'acide arachidonique (Aliberti, Serhan et al. 2002). Cet eicosanoide supprime l'expression du CCR-5, récepteur requit par l'antigène du toxoplasme pour la synthèse de l'IL-12. Ce même mécanisme est mis en jeu lors d'une infection naturelle par *T. gondii*. En effet, des souris déficientes en (5-LO) enzyme nécessaire à la production de la LXA4 montrent une réponse exacerbée en IL-12 et meurent suite à leur infection par *T.gondii* tout comme les souris IL-10 KO malgré une baisse de leur charge parasitaire (Gazzinelli, Wysocka et al. 1996).

II- L'immunité adaptative

II-1- Présentation des antigènes au système immunitaire

Les défenses immunitaires de l'organisme vis-à-vis des pathogènes et des cellules malignes reposent en grande partie sur la surveillance par les lymphocytes T cytotoxiques. Les antigènes peptidiques sont constamment présentés au système immunitaire qui fait la différence entre le soi et le non soi. Le système immunitaire va tolérer les antigènes du soi tandis que les antigènes du non- soi suscitent un panel de réactions immunes dirigées contre l'antigène étranger. Cette reconnaissance antigénique est possible grâce à la présentation des antigènes aux lymphocytes T associés au complexe majeur d'histocompatibilité CMH (appelé aussi HLA pour human leucocyte antigens). Les molécules du CMH sont de deux classes (I et II), ce qui permet une présentation différente des antigènes selon leur localisation cellulaire (Harding, Song et al. 1995).

II-1-1- La voie de présentation utilisant le CMH de classe I : voie endogène ou exogène (cross-présentation)

a- La Voie endogène

les peptides présentés par les molécules de classe I du CMH sont issus :

- de la dégradation des protéines endogènes, codées par le génome cellulaire et celles issus de pathogènes infectant la cellule, et synthétisées par les cellules présentatrices.
- du produit de dégradation des compartiments subcellulaires, le lysosome et le cytosol, dotés de capacité protéolytique importante (Ciechanover 2005; Wilson and Villadangos 2005).

Dans le cytosol, les protéines sont dégradées par le protéasome, un grand complexe protéolytique composé d'une structure cylindrique formée par 28 protéines et qui occupe une place centrale dans le métabolisme cellulaire. Le protéasome est capable de dégrader la quasi-totalité des protéines en produisant des fragments de 4 à 15 résidus (Baumeister, Walz et al. 1998). Ces peptides sont ensuite transportés dans la lumière du réticulum endoplasmique (RE) site d'assemblage avec les molécules CMH I, grâce à un système

transporteur de protéine porté par la membrane de (RE) et appelé les protéines TAP (transporter associated with antigen processing), ce dernier est composé de deux sous unités homologues (TAP1 et TAP2) et appartient à la grande famille des protéines ABC, qui utilisent l'énergie fournie par l'hydrolyse de l'ATP pour transporter des solutés à travers les membranes (van Endert, Saveanu et al. 2002). Dans le RE il y a formation d'un complexe entre un peptide et une molécule CMH I qui implique l'action de quatre protéines chaperons différentes dont trois appartiennent au système de contrôle de qualité du RE, qui empêche les protéines de conformation non adéquates de sortir de ce compartiment (Cresswell, Bangia et al. 1999). Le complexe « peptide-molécule CMH I » est ensuite véhiculé vers l'appareil de Golgi, à partir duquel des vésicules golgiennes contenant le complexe sont émises et viennent fusionner avec la membrane plasmique cellulaire. Le peptide antigénique associé à la molécule CMH de classe I se trouve donc exposé à la surface cellulaire avec une partie intégrée à la double couche phospholipidique de la membrane plasmique. L'ensemble « peptide-molécule CMH I » ainsi présenté peut être reconnu par le récepteur des lymphocytes T (TCR). Tandis que le peptide est reconnu par le TCR, la molécule de CMH I est reconnue par une molécule appelée CD8 portée par le lymphocyte T, ajouté à l'action d'autres molécules de costimulation présentent sur les cellules présentatrices d'antigènes, les lymphocytes T CD8+ sont activés.

b- La cross-présentation

Les cellules dendritiques ont une voie de transport transmembranaire qui relie la lumière des compartiments endocytaires au cytosol. Ce transport permet aux antigènes internalisés d'accéder à la voie cytosolique de présentation antigénique par le CMHI (Rodriguez, Regnault et al. 1999). Cette voie, comme la voie endogène est TAP-dépendante (Guermonprez, Saveanu et al. 2003; Cresswell, Ackerman et al. 2005).

II-1-2- la voie de présentation utilisant le CMH de classe II ou voie exogène

Cette voie de présentation antigénique est utilisée par les cellules présentatrices d'antigène (CPA) pour présenter les peptides produits de la dégradation des antigènes exogènes à la cellules mais internalisés par endocytose puis dégradés. La dégradation en peptides des antigènes endocytés est assurée dans l'endosome par les protéases-acide-dépendantes. Les molécules CMH II sont transportées de la lumière du RE et à travers l'appareil de Golgi jusqu'aux endosomes ou elles formeront avec les peptides déjà

présents un complexe « peptides-CMH II ». Le complexe formé est transporté jusqu'à la surface cellulaire pour être reconnu par le TCR des lymphocytes T CD4+ appelées aussi lymphocyte T helper (Watts 2004). Les macrophages qui expriment un faible taux de CMH II acquièrent leur capacité à présenter les antigènes après leur activation par des médiateurs tel que l'IFN-γ et le GM-CSF.

Les lymphocytes B sont capables de présentation antigénique suite à l'internalisation des antigènes capturés via leur récepteur appelé BCR.

Les cellules dendritiques qui sont les principales cellules présentatrices d'antigènes sont incapables de former le complexe peptide-CMH II lorsqu'elles sont à l'état immature. Leur maturation leur permet de présenter des peptides internalisés avant la maturation (Bryant and Ploegh 2004).

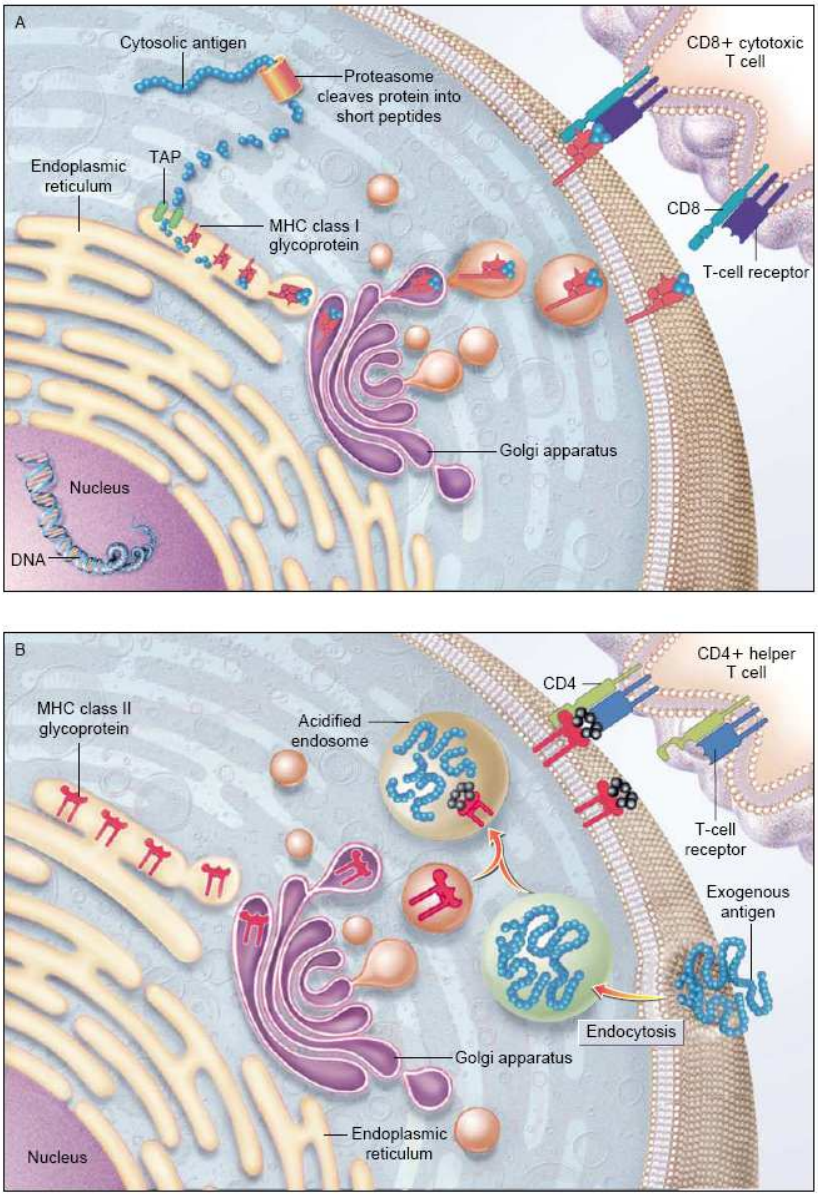


Fig14 : Présentation des antigènes aux lymphocytes T dans le cadre de la molécule du CMH. (A) la voie endogène de présentation empreintée par les antigènes faisant intervenir les protéines associées au transport TAP1 et TAP2 ainsi que le CMHI, Le complexe antigène-CMH est transporté par les véshicules golgiennes jusqu'à la surface de la cellule pour être présenté aux lymphocytes T CD8+. (B) la voie exogène de présentation antigènique empreintée par les antigènes exogènes suite à leur endocytose ou phagocytose. Les antigènes sont dégradés au niveau des endosomes acidifiés puis complexés aux molécules de CMHII. Le complexe antigène-CMH est véhiculé jusquà la surface cellulaire pour être présenté aux lymphocytes T CD4+ (d'après McDonnell et *al* 1996).

II-2- La présentation CMHI, CMHII de *T. gondii*

Par l'utilisation de parasites exprimant des protéines hétérologues telles que l'ovabulmine ou la β-galactosidase, exprimées soit au stade tachyzoïte ou bradyzoïte, soit dans le cytoplasme, soit sécrétées, Kwok et al (2003) et Pepper et al (2004), ont analysé les réponses LTCD4+ ou LTCD8+, spécifiques de ces antigènes après infection des souris (Kwok, Lutjen et al. 2003; Pepper, Dzierszinski et al. 2004) .

L'infection par voie orale de souris C57BL /6xBALB/c (H-2^{db}) avec la souche PRU exprimant la β-galactosidase au stade tachyzoïte, et sous forme sécrétée, conduit à la mise en place d'une réponse CD8+ spécifique de la β-galactosidase, dans la rate et le cerveau des souris infectées. Des LTCD8+ spécifiques de la β-galactosidase, n'ont pas été détectés si la β-galactosidase est exprimée par les tachyzoïtes dans le cytoplasme, ni si elle est exprimée par les bradyzoïtes, qu'elle soit dans le cytoplasme ou sécrétée. Ces LTCD8+, identifiés par la technologie des tétramères, sécrètent de l'IFN-γ et ont une activité cytotoxique après restimulation *in vitro* (Kwok, Lutjen et al. 2003). *In vitro*, les cellules dendritiques, les macrophages les fibroblastes et les astrocytes présentent un peptide CMHI de l'ovalbumine suite à l'infection active par un parasite exprimant une forme sécrétée de l'ovalbumine (Dzierszinski, Pepper et al. 2007). Cette présentation via la voie endogène n'exclue pas *in vivo* une présentation par voie exogène (cross-présentation).

L'infection par voie intrapéritonéale de souris BALB/c ayant préalablement reçu des cellules DO11, cellules qui reconnaissent un peptide CD4 spécifique de l'ovalbumine, avec la souche PRU exprimant une forme sécrétée de l'ovabulmine induit la prolifération des cellules DO11, leur activation et leur capacité à produire de l'IFN-γ (Pepper, Dzierszinski et al, 2004). Les cellules DO11 ne sont pas activées après infection des souris avec la souche PRU exprimant une forme cytosolique de l'ovalbumine.

II-3- Immunité à médiation humorale

Lors d'une primo-infection avec *T.gondii* une réponse humorale spécifique est mise en place par l'hôte infecté. Elle se traduit par la production d'anticorps de type IgM, IgA, IgG chez la souris et par la production d'anticorps de type IgM, IgA, IgG et IgE chez l'homme.

II-3-1- Détection et Cinétique de la réponse humorale

Trois à dix jours après l'infection avec *T. gondii*, des IgM spécifiques du toxoplasme sont détectés dans le sérum de l'hôte infecté. Les IgM sont retrouvés essentiellement pendant la phase aiguë de la maladie, mais peuvent dans certains cas persister quelques mois après l'infection (Del Bono, Canessa et al. 1989; Gorgievski-Hrisoho, Germann et al. 1996). Des IgM spécifiques peuvent également apparaître au cours d'une réactivation de toxoplasmose congénitale, il est possible de ce fait qu'ils persistent longtemps suite à une micro-réactivation persistante des kystes de toxoplasme (Sibalic, Djurkovic-Djakovic et al. 1990).

Les IgA sont sécrétés après les IgM et persistent jusqu'à six à sept mois après infection, leur sécrétion est induite par l'IL-10 et le TGF-β (Defrance, Vanbervliet et al. 1992).

Chez l'espèce humaine, des IgA anti-*T. gondii* ont été détectées dans le lait maternel chez des femmes présentant aussi bien une phase aiguë que chronique de l'infection. Ces IgA sont dirigées contre un large éventail d'antigènes dont le poids moléculaire varie de 14 à 100 kDa (Mack and McLeod 1992).

Toujours chez l'homme, l'investigation de la réponse locale et systémique suite à une toxoplasmose oculaire montre une réponse humorale locale (IgG et IgA anti-*T. gondii* dans l'humeur aqueuse) plus importante que celle observée au niveau systémique. Selon une étude sur 47 malades menée au service d'ophtalmologie à l'Université de Berne, la réponse locale mettant en jeu des IgA anti-*T. gondii* concerne 35% des cas d'infection (Garweg, Garweg et al. 2004).

Chez le chat des IgA reconnaissant des antigènes de tachyzoïtes de 24, 34, 38 et 43 kDa ainsi qu'un antigène de sporozoïte de 24 kDa ont été détectés au niveau des sécrétions intestinales après leur infection par voie orale avec des kyste de *T. gondii*

(Omata, Terada et al. 1997). Des IgG sont également présent au niveau du tractus intestinal du chat, et coopèrent avec les IgA pour prévenir l'infection (Omata, Terada et al. 1997). Comme pour l'homme, des IgA anti-*T. gondii* ont été détectées dans l'humeur aqueuse de chats présentant une toxoplasmose oculaire (Lappin, Burney et al. 1995).

L'infection expérimentale de souris OF1 avec la souche 76K a permis l'étude de la réponse IgA anti-*T. gondii* aussi bien au niveau systémique (dans le sérum) que local (des sécrétions intestinales ainsi que dans le lait maternel). Les IgA apparaissent dans le sérum et dans le lait maternel au cours de la deuxième semaine après l'infection tandis qu'au niveau intestinal les IgA apparaissent pendant la troisième semaine d'infection et persistent pendant toute la durée de l'expérience qui est de 17 semaines. Les IgA intestinales semblent reconnaître des antigènes de toxoplasme de 22 kDa (SAG2), 30 kDa (SAG1) et 43 kDa (SAG3) ainsi que des protéines de rhoptries de 55 et 60KDa (Chardes, Bourguin et al. 1990) et une protéine de granule dense GRA4 de 40 kDa (Mevelec, Chardes et al. 1992). Les IgA du lait maternel de souris reconnaissent les antigènes de 30 et 43 kDa.

La production des IgG survient après celle des IgM et IgA. Cependant une étude faite chez la souris a montré que les IgG sont sécrétées en même temps que les IgAs dans le sérum et le lait maternel (Chardes, Bourguin et al. 1990). Chez l'homme, l'analyse des différentes sous-classe des IgG a montré que les IgG4 sont rarement retrouvés, les IgG1 restent dans tous les cas la sous-classe dominante (Derouin, Sulcebe et al. 1987; Huskinson, Stepick-Biek et al. 1989). Les souris produisent majoritairement des IgG2a et peu d'IgG1 (Burke, Roberts et al. 1994). Ces sous-classes dominantes, que ce soit chez l'homme ou la souris (IgG1 pour l'homme et IgG2a pour la souris) sont produites par les cellules B activées par les cellules Th1. Les IgG sont produits durant toute la vie de l'hôte et signent la phase chronique de l'infection. Les antigènes reconnus par les IgG sont plus nombreux et incluent les antigènes reconnus par les IgM et les IgA. Au cours de la phase aiguë de l'infection ces immunoglobulines sont dirigées essentiellement contre les antigènes membranaires de 30 kDa, 43 kDa et 97 kDa (Decoster, Darcy et al. 1988).

Chez l'homme, les IgE sont détectés pendant la phase aiguë de la maladie (Foudrinier, Villena et al. 2003). Tandis que chez la souris les IgE ne se développent pas suite à une infection par *T.gondii* mais peuvent se développer suite à l'immunisation par

de l'antigène de toxoplasme, dans ce cas les IgE anti-*T. gondii* sont faiblement sécrétés et ne persistent pas longtemps. L'IFN-γ produit suite à l'infection par *T.gondii* est à l'origine de l'absence des IgE chez les souris infectées.

II-3-2- Etude du rôle de la réponse humorale *in vitro*

Des études suggèrent que les anticorps seuls ou en coopération avec l'immunité cellulaire participent à la limitation de la dissémination du parasite. En effet, lorsque le parasite pénètre activement une cellule phagocytaire non activée, sa vacuole parasitophore échappe à la fusion avec les lysosomes, et donc à son acidification. Lorsque les anticorps monoclonaux recouvrent le toxoplasme avant son internalisation, ils sont opsonisants et favorisent la phagocytose par les macrophages, conduisant à la formation d'un phagolysosome qui permet la lyse du parasite (Hauser and Remington 1981; Amer and Swanson 2002).

Des anticorps développés contre les antigènes excrétés/secrétés de *T.gondii* induisent *in vitro* l'agglutination et la destruction des tachyzoïtes extracellulaires en présence du complément (Costa-Silva, Meira et al. 2008). Ainsi, les IgA isolées à partir du lait maternel des femmes en phase aiguë de l'infection sont capables de réduire l'infection des entérocytes jusqu'à 75% par leur pouvoir à agglutiner le parasite. Les IgA sécrétoires humain interviennent pour limiter l'infection des entérocytes (Mack and McLeod 1992).

Les anticorps ont également un rôle dans la neutralisation de la pénétration du toxoplasme dans la cellule hôte, notamment les anticorps monoclonaux et polyclonaux dirigés contre SAG1. Ainsi, Mineo *et al* (1993) ont décrit la capacité des anticorps dirigés contre SAG1 à bloquer l'infection des fibroblastes humains et des entérocytes murins par le parasite *in vitro*. De même Grimwood *et al* ont décrit un anticorps monoclonal dirigé contre SAG1 bloquant l'invasion par le parasite des cellules bovines de reins. Cependant, des anticorps monoclonaux dirigés contre d'autres protéines de surface (SAG2 et 3), de micronèmes (MIC3), de rhoptries et de granules denses (GRA1) n'ont pas d'effet sur l'invasion du parasite (Mineo, McLeod et al. 1993; Grimwood and Smith 1996). Néanmoins, des anticorps monoclonaux anti-GRA2 et GRA6 et polyclonaux anti-ROP2 inhibent, *in vitro*, l'invasion par le parasite des fibroblastes et des macrophages cultivés en conditions adhérentes. Cette inhibition est plus efficace en présence du complément (Cha, Song et al. 2001; Mishima, Xuan et al. 2002).

Des anticorps pouvant bloquer la réplication du parasite dans la cellule hôte sans altérer les mécanismes d'interaction entre le parasite et son hôte ont été décrit (Mineo, Khan et al. 1994). Cependant, les anticorps neutralisants qu'ils soient d'action extra ou intracellulaire n'empêchent pas la pénétration ou la multiplication du parasite dans des monocytes humains non adhérents et non activés (Fadul, Channon et al. 1995). Cette constatation expliquerait la dissémination de *T. gondii* dans l'organisme à la faveur de cellules circulantes.

II-3-3- Etude du rôle de la réponse humorale *in vivo*

Les tests de protection présentent des résultats plus mitigés, parfois contradictoires selon les équipes et le modèle expérimental utilisé. Le transfert passif d'anticorps dirigés contre des antigènes sécrétés-excrétés de T. gondii et dont la taille varie de 20 à 108 kDa confère à des rats nudes atymiques, hautement sensibles à l'infection par la souche virulente RH de T. gondii, une protection significative en terme de retard de mortalité (Darcy, Deslee et al. 1988)

Pavia et al ont également montré que l'administration de sérum d'animaux ayant été infectés par le toxoplasme confère une protection contre une toxoplasmose létale chez le cochon de guinée. Les animaux ayant reçu des immunoglobulines anti-T. gondii sont protégés de la même façon que ceux qui ont reçu un transfert passif des cellules B ce qui met en avant le rôle des lymphocytes B dans l'immunité anti-T. gondii (Pavia, Bittker et al. 1992).

Ridel et al ont montré que les IgE jouent un rôle lors d'une infection par T. gondii. En effet les rats immunodéprimés de la souche Nu/Nu développent une infection létale due au toxoplasme. Le transfert à ces animaux de sérum de 28 jours d'infection au toxoplasme de rats fischer +/+ immunocompétents entraîne un retard de mortalité significatif, la déplétion des IgE présents dans le sérum entraîne son inefficacité. De plus les IgE spécifiques dirigés contre les antigènes sécrétés-excrétés de T. gondii présentent une activité cytotoxique contre le parasite in vitro (Ridel, Auriault et al. 1988).

Certains monoclonaux utilisés dans des expériences de transfert passif offrent une protection significative aux souris contre l'infection par des souches peu virulentes à virulentes de *T. gondii*. Ces monoclonaux sont dirigés contre les antigènes de 14 et 35 kDa (Johnson, McDonald et al. 1983).

A l'inverse des travaux de Johnson, les travaux de Kasper et al montrent que le transfert passif d'un monoclonal anti-SAG1 (antigène de 30 kDa) ne confère aucune protection aux souris suite à leur infection par T. gondii (Kasper, Currie et al. 1985).

II-3-4- Rôle des lymphocytes B

Finalement, il est intéressant de signaler le rôle direct des lymphocytes B dans la limitation de l'infection. Kang et al ont montré que des souris déficientes en cellules B (C57BL/6) succombent à la phase chronique de la maladie suite à une infection par voie orale avec une souche atténuée de toxoplasme (ME49, type II), la charge parasitaire au niveau des différentes organes de ces souris est significativement plus élevée comparée au souris sauvages contrôles (Kang, Remington et al. 2000). L'administration d'anticorps polyclonaux purifiés, anti-*T. gondii*, issus d'un lapin préalablement infecté avec la souche Me49, prolonge la survie des souris déficientes en cellules B (Kang, Remington et al. 2000). Les cellules B (B-1) issues de souris infectées préalablement par voie orale avec des kystes de la souche avirulente Fukaya, puis transférées passivement à des souris déficientes en cellules B (C57BL/6) protègent celles-ci contre une infection contrairement aux cellules B naïves qui ne confèrent aucune protection. De plus les souris déficientes en cellules B ayant reçu les lymphocytes B activés sont capables de la production lors de l'infection de cytokines aussi bien de type Th1 que Th2 ainsi que l'oxyde nitrique, associée à une production plus marquée d'IL-12, en l'absence d'anticorps détectables dans le sérum. Cette réponse immune confirme le rôle important des cellules B dans la protection contre l'infection à *T. gondii* (Chen, Mun et al. 2003) vraisemblablement de par leur action sur la fonction des macrophages et sur la réponse cellulaire T. Des cellules B-1 activées produisant de l'IL-12 et de l'IFNγ suite à une infection par *T. gondii* ont déjà été identifiées (Harris, Haynes et al. 2000). Par ailleurs, Menard et al (2007), ont montré dans des expériences de transferts passifs que les cellules B issues de souris infectées augmentent l'expression de l'IFN-γ par les cellules T et que cette augmentation est médiée par le TNF-α membranaire exprimé par les cellules B, par contact direct avec les cellules T (Menard, Minns et al. 2007).

Le rôle des cellules B dans le cadre d'une vaccination est controversé. En effet si des souris C57BL/6, déficientes en cellules B, immunisées par des tachyzoïtes d'une souche

atténuée de *T. gondii* (ts4*)* ne sont pas protégées contre une infection d'épreuve par voie intrapéritonéale avec une souche virulente de type I (RH) (Sayles, Gibson et al. 2000), ces mêmes souris survivent à une épreuve avec une dose léthale d'une souche de type II (Me49) par voie orale ou intrapéritonéale (Johnson, Lanthier et al. 2004).

II-4- L'immunité à médiation cellulaire :

En plus de l'immunité humorale, le parasite induit chez l'organisme hôte une immunité à médiation cellulaire qui protège l'hôte contre la multiplication rapide du parasite à l'origine de nombreuses pathologies. De plus, suite à l'infection par le toxoplasme, la persistance de la pression immune est essentielle pour éviter la réactivation de la maladie pendant sa phase chronique. En effet, sous la pression du système immunitaire, les tachyzoïtes se transforment en bradyzoïtes qui s'enkystent pour échapper à la réponse immune, c'est la forme latente de la toxoplasmose. Ces kystes sont retrouvés essentiellement au niveau du système nerveux central. La réactivation de ces kystes au niveau du cerveau chez les immunodéprimés s'accompagne par des neuropathologies tel que l'encéphalite, majeure cause de morbidité et de mortalité chez les malades du SIDA (Luft, Brooks et al. 1984; Navia, Petito et al. 1986; Suzuki, Conley et al. 1989).

L'IFN-γ joue un rôle central dans le maintien d'une pression immune à l'origine du contrôle de la multiplication du parasite. Des expériences de déplétion de l'IFN-γ chez des souris en phase chronique de l'infection entraîne l'émergence de la forme tachyzoïte ainsi que l'augmentation du nombre de kystes cérébraux (Suzuki, Conley et al. 1989).
Comme L'IFN-γ, les CD8+ jouent un rôle crucial dans la mise en place d'une immunité protectrice contre le toxoplasme aussi bien pendant la phase aiguë que chronique de l'infection. Dans la réponse adaptative, les T CD8+, les T CD4+, les NK, et les γδ T cells sont des cellules productrices de l'IFN-γ.

II-4-1- Rôle de l'IFN-γ

L'IFN-γ est un médiateur important dans la résistance de l'hôte contre le parasite (Suzuki Y 1988). L'IFN-γ ainsi que d'autres molécules pro-inflammatoires qui interviennent lors de la phase aiguë de l'infection sont essentielles au développement d'une immunité adaptative anti-toxoplasmique. Le rôle de l'IFN-γ dans la résistance au toxoplasme a fait l'objet d'études *in vivo*. Le traitement par l'IFN-γ de souris CBA/Ca en

phase de toxoplasmose chronique suite à leur infection par la souche ME49 réduit le nombre de sites inflammatoires au niveau du parenchyme cérébral indiquant le rôle de l'IFN-γ dans le traitement de la toxoplasmose cérébrale (Suzuki, Conley et al. 1990). Le défaut de production de l'IFN-γ par les souris IFN-γ KO est corrélé à la réplication incontrôlée du parasite conduisant à la mort des animaux 3 à 4 semaines après infection orale par *T.gondii* (Liesenfeld 1999).

L'IFN-γ déclenche la sécrétion des chimiokines par les macrophages, molécules essentielles au recrutement d'un grand panel de cellules immunes tel que les APC ou encore les lymphocytes T. L'action de synergie de l'IFN-γ avec l'IL-12 assure la différentiation des cellules Th1 à partir des lymphocytes T helper. En présence du parasite, les macrophages stimulés par l'IFN-γ sécrètent de l'IL-12. L'IFN-γ est également à l'origine de l'expression du récepteur de l'IL-12 sur les lymphocytes T. La liaison de l'IL-12 par son récepteur sur les lymphocytes T induit la phosphorylation du facteur de transcription STAT4 essentiel à la différentiation des cellules T en lymphocytes de profil Th1 (Bacon, Petricoin et al. 1995)
L'un des mécanismes de protection de l'IFN-γ est l'augmentation de l'expression de la molécule d'histocompatibilité de classe I par les cellules présentatrices de l'antigène. La présentation de l'antigène par les APC aux lymphocytes CD8+ induit l'activation des T CD8+ et une activité cytotoxique spécifique de l'antigène (Boehm, Klamp et al. 1997; Ely, Kasper et al. 1999; Nakano, Hisaeda et al. 2001).

Comme lors de la réponse innée, l'IFN-γ exerce un fort pouvoir anti-parasitaire. En effet, l'activation des entérocytes par l'IFN-γ inhibe la réplication intracellulaire de *T. gondii* en limitant la disponibilité en Fer (Dimier and Bout 1998). Combiné au TNF-α, l'IFN-γ active la production d'oxide nitrique par les macrophages limitant ainsi la réplication du parasite (Adams, Hibbs et al. 1990; Langermans, van der Hulst et al. 1992; Stenger, Donhauser et al. 1996). L'IFN-γ induit également la dégradation du tryptophane dans les cellules hématopoïétiques ou non hématopoïétiques infectées (Silva, Rodrigues et al. 2002).

II-4-2- Activation des lymphocytes TCD8+ et TCD4+

En plus du rôle de l'IFN-γ, des expériences ont montré l'importance de cellules T lors de l'infection à *T. gondii*. En effet, des souris nudes atymiques sont extrêmement

sensibles à l'infection par des souches aussi bien virulente qu'atténuées du toxoplasme (Lindberg and Frenkel 1977; Gazzinelli, Hieny et al. 1993). De plus, le transfert passif de cellules T activées par le toxoplasme à des souris naïves protègent celles-ci contre une infection d'épreuve avec des souches virulentes de *T.gondii* (Parker, Roberts et al. 1991; Pavia, Bittker et al. 1992; Buzoni-Gatel, Lepage et al. 1997). Plus important encore, la corrélation étroite entre le développement d'encéphalites toxoplasmiques et la diminution du nombre de cellules T périphériques chez des patients atteints du SIDA met en évidence le rôle crucial des lymphocytes T dans le contrôle de l'infection chronique.

La mise en place d'une immunité spécifique lors de l'infection par *T. gondii* fait intervenir la coopération et l'interaction entre les deux populations lymphocytaires les LT CD4+ et les LT CD8+. En effet, les travaux de Gazzinelli et *al* ont montré que l'infection des souris B6 déplétées en cellules T CD4+ et T CD8+ par la souche avirulentes ME49 se révèle mortelle (Gazzinelli, Xu et al. 1992). Le transfert de cellules spéniques T CD4+ et/ou T CD8+ issues de souris immunes, à des souris saines soumises à une infection virulente ultérieure, ont démontré que les lymphocytes T CD8+ sont les médiateurs majeurs de la résistance à l'infection aiguë mais que l'expression maximale de leur activité nécessite une action synergique des cellules T CD4+ (Suzuki and Remington 1988; Parker, Roberts et al. 1991). Pendant la phase chronique de l'infection les LTCD4+ jouent une rôle primordiale pour maintenir la pression immune, en effet, suite à la déplétion des LTCD4+ chez des souris C3H/HeN/MTV infectées, on observe la réactivation de la toxoplasmose au niveau du système nerveux centrale (Vollmer, Waldor et al. 1987). Les cellules T CD8+ jouent un rôle majeur dans le contrôle de la formation des kystes puisque le transfert de cellules T CD8+ immunes protège les souris receveuses contre le développement des kytes cérébraux et que la déplétion *in vivo* des cellules T CD8+ convertit des souris résistantes à l'enkystement en souris sensibles (Brown and McLeod 1990; Parker, Roberts et al. 1991).

a- Les lymphocytes cytotoxiques CD8+ :

L'activité protectrice des lymphocytes T $CD8^+$ s'exerce par le biais de leurs activités cytolytiques spécifiques et de leur synthèse d'IFN-γ. En effet, l'injection à des souris de la souche atténué ts-4 génère des lymphocytes TCD8+ effecteurs, ces cellules coopèrent avec les LT CD4+ pour conférer une immunité protectrice contre une infection avec la souche virulente RH de *T. gondii*. Cette immunité est due non seulement à la sécrétion de

l'IFN-γ par les LTCD8+ mais aussi à leur activité cytotoxique par laquelle elles éliminent les cellules cibles infectées par le parasite (Subauste, Koniaris et al. 1991; Denkers, Gazzinelli et al. 1993). La capacité des LTCD8+ à synthétiser de d'IFN-γ est supportée par plusieurs travaux. En effet, des souris naïves ayant reçu passivement des lymphocytes TCD8+ de souris vaccinées avec la souche ts-4 voient s'abroger leur protection contre une infection au toxoplasme suite à leur traitement simultané avec un anti-IFN-γ (Suzuki and Remington 1990). Les travaux de Khan (Khan, Ely et al. 1994) ont montré que ce même traitement abolit la protection induite contre la phase aiguë de l'infection par le transfert de lymphocytes T CD8+ spécifiques de l'antigène SAG-1. Il a également été démontré que l'administration d'IFN-γ exogène à des souris KO IL-12 (et dont la production d'IFN-γ est diminuée) permet d'augmenter la fréquence des précurseurs de lymphocytes T CD8+ cytotoxiques (CTL) ainsi que la production d'IFN-γ par les T CD8+ et restaure ainsi une protection vis-à-vis de l'infection (Ely, Kasper et al. 1999).

Une activité cytolytique des cellules T CD8+ spléniques de souris BALB/c vaccinées par des bradyzoites de la souche beverley ou par l'antigène total de la souche RH, est spécifiquement dirigée contre des macrophages J774A.1 infectés in vitro par la souche RH, cette activité cytotoxique décrite est indépendante de la production d'IFN-γ (Nakano, Hisaeda et al. 2001). L'activité cytotoxique des LTCD8+ s'exerce à l'encontre de macrophages préincubés avec des fractions antigéniques solubles (Denkers, Gazzinelli et al. 1993) ou infectés par T. gondii in vitro. La lyse de ces cellules entraîne la libération des tachyzoïtes dans l'espace extracellulaire où ils seraient détruits ensuite par les macrophages activés par l'IFN-γ (Denkers, Gazzinelli et al. 1993).

Dans le cas d'une infection par voie orale mimant la voie naturelle de l'entrée du parasite, une population lymphocytaire intraépithéliale (LIE) CD8α/β TCR positive recrutée et ainsi sensibilisée induit une protection lors d'un transfert passif in vivo. Elle est également capable de production de l'IFN-γ et d'activité cytotoxique contre des entérocytes infectés par le parasite in vitro (Chardes, Buzoni-Gatel et al. 1994; Buzoni-Gatel, Lepage et al. 1997; Lepage, Buzoni-Gatel et al. 1998).

Les LIE sensibilisés peuvent grâce à l'expression de l'αEβ7 migrer vers l'intestin, le traitement de souris par un anticorps anti-αEβ7, qui inhibe partiellement la migration, diminue la résistance de l'hôte à l'infection par T. gondii (Buzoni-Gatel, Debbabi et al.

1999). Par ailleurs, les LIE de souris infectées augmentent l'expression du récepteur de chimiokine CCR5 dont le rôle semble également important dans leur migration intraepithéliale et la régulation de la réponse inflammatoire (Luangsay, Kasper et al. 2003). La sous-population des LIE, TCRγ/δ sensibilisée produit du TGF-β en quantité importante, qui permet de protéger les souris receveuses, en particulier C57BL/6, de l'inflammation iléale létale qui se produit dans les 10 jours suivant l'infection (Buzoni-Gatel, Debbabi et al. 2001). La sous-population TCRγ/δ, activée par l'IL-15, tue les entérocytes infectés par cytotoxicité, limitant l'invasion mais causant des dommages épithéliaux (Schulthess, Fourreau et al. 2008).

Par l'utilisation d'une souche PRU de type II exprimant la β-galactosidase dans la vacuole parasitophore, Kwok et al (2003) ont observé que la réponse CD8+ spécifique de la β-galactosidase est maximale dans la rate et le cerveau 23 jours après l'infection et qu'elle est ensuite maintenue dans le cerveau tandis qu'elle diminue dans la rate. Cette réponse n'est observée que si la β-galactosidase est exprimée par le stade tachyzoïte (Kwok, Lutjen et al. 2003).

L'expression maximale de l'activité des lymphocytes T CD8+ requiert cependant une action synergique des cellules T CD4+ (Suzuki and Remington 1988). Ainsi, chez l'homme, la co-incubation de cellules présentatrices d'antigènes infectées et de lymphocytes T CD4+ entraîne une forte prolifération qui n'est pas observée lorsque ces CPA sont incubées en présence de lymphocytes T CD8+.(Purner, Berens et al. 1996). Suite à une infection par voie orale de souris BALB/c x C57BL/6 (H-2db) avec une souche de type II exprimant la β-galactosidase, Lütjen et al (2006) ont mis en évidence la présence de LT CD8+ spécifiques du peptide 876-884 de la β-galactosidase dans le cerveau des souris. La déplétion en cellules CD4+ avant l'infection conduit à une diminution significative des LT CD8+ activés (producteurs d'IFN-γ et cytolytiques) dans le cerveau. Après arrêt de la déplétion et retour à une réponse CD4+ normale, l'activité des LTCD8+ intracérébraux n'est pas restaurée. Un effet sur l'activité fonctionnelle des LTCD8+ du cerveau est également observé suite à une déplétion des CD4+ au cours de la phase chronique de l'infection (Lutjen, Soltek et al. 2006).

b- Rôle effecteur des lymphocytes T CD4+

Les lymphocytes T CD4+ peuvent intervenir par le biais de deux mécanismes : la cytotoxicité et la production de cytokines. L'activité cytotoxique de ces lymphocytes sur

les cellules infectées par T. gondii est restreinte au CMH II et a été mise en évidence dans le sang de patients en phase chronique d'infection, par Curiel (Curiel, Krug et al. 1993; Yang, Aosai et al. 1995). Cependant, l'activité cytotoxique des LTCD4+ est rencontrée surtout chez l'espèce humaine (Curiel, Krug et al. 1993; Yang, Aosai et al. 1995; Montoya, Lowe et al. 1996). Inversement, chez la souris, les études ne montrent pas une activité cytotoxique due aux LTCD4+ (Subauste, Koniaris et al. 1991).

Les cellules T CD4+ représentent la plus grande sous-population de lymphocytes T de la lamina propria. Lors d'une infection naturelle à T. gondii, les cellules T CD4+ sont activées par les cellules présentatrices de l'antigène au niveau des ganglions mésentériques et recrutées au niveau du site d'infection pour produire de grandes quantités d'IFN-γ et de TNF-α. A l'état naïf, les lymphocytes CD4+ expriment constitutivement le récepteur chimiokinique le CCR7. Une fois activées les cellules T CD4+ réduisent l'expression de leur CCR7 et augmentent l'expression de leur récepteurs CCR2, CCR5 et CCR9 et CXCR3 qui intéragissent avec les chimiokines produites par les cellules épithéliales infectées et par les APC activées (Bachmann, Kopf et al. 2006). Les cellules LT CD4+ de la lamina propria sont une population cellulaire clé dans la génération d'iléite ches les souris C57BL/6. Ainsi, les souris déplétées en CD4+ survivent à la phase aiguë de l'infection mais perdent leur aptitude à contrôler la réplication du parasite (Liesenfeld, Kosek et al. 1996).

Les souris C57BL/6 LT CD4-/- infectées par voie orale avec la souche 76K sont protégées contre une réaction inflammatoire exagérée, elles montrent une réponse CD8+ normale et spécifique aux antigènes de T. gondii, de plus la génération de précurseurs des lymphocytes T cytotoxiques et la production d'IFN-γ sont identiques à celles observées chez les souris sauvages, cependant les souris $CD4^{-/-}$ sont incapables de maintenir à long terme une immunité cellulaire T CD8+ (180 jours post infection) (Casciotti, Ely et al. 2002). Les souris BALB/c $CD28^{-/-}$ sont résistantes à une infection par voie intrapéritonéale avec la souche ME49. Cependant, ces souris réinfectées en phase chronique avec la souche RH meurent alors que les souris sauvages résistent à la réinfection. Chez les souris CD28-/- cette mortalité est associée à une diminution de l'IL-12, de l'IFN-γ et du nombre de cellules CD4 mémoires.

II-5- Régulation de la réponse immune suite à l'infection par Toxoplasma gondii

La production de chimiokines et de cytokines pro-inflammatoire est une condition requise pour le contrôle de la réplication intracellulaire de T.gondii empêchant la dissémination du parasite et les lésions tissulaires qu'il provoque. Cependant cette réaction inflammatoire peut être dangereuse pour l'hôte si elle n'est pas contrôlée. Une réaction inflammatoire exacerbée est en fait à l'origine de pathologie inflammatoire au niveau des intestins chez la souris C57BL/6.

Le parasite est capable d'interférer dans l'expression des molécules CMH classe II, en effet, il bloque l'expression de cette molécule au niveau des cellules hématopoïetiques et non hématopoïetiques, entraîne également la baisse de l'expression du CMHII au niveau des macrophages (Luder, Lang et al. 1998; McKee, Dzierszinski et al. 2004). La diminution de l'expression du CMH classe II par les APC entraîne la faible activation des cellules CD4+ naïves ayant pour effet la faible prolifération des CD4+ et le blocage de la fonction effectrice des lymphocytes T helper. Ceci aboutit à une réponse T CD4+ moins importante et moins developpée que la réponse LTCD8+ (Luft, Kansas et al. 1984; Sklenar, Jones et al. 1986; McKee, Dzierszinski et al. 2004).

C- La Vaccination contre le toxoplasme

Les pertes économiques causées par l'infection par *T. gondii* dans les élevages, mais également les problèmes rencontrés chez l'homme immunodéprimé ou chez la femme enceinte, nécessitent la mise en place de solutions immunologiques et le développement de vaccins. Chez l'animal domestique, ces vaccins pourraient prévenir les avortements et réduire aussi l'infection chez l'homme. Le développement de ces vaccins peut être mené soit par immunisation des hôtes intermédiaires du parasite, soit par immunisation de l'hôte définitif, le chat, pour éliminer la dissémination du parasite. Les approches vaccinales anti-toxoplasmique n'ont pas cessé d'évoluer. Après les vaccins vivants atténués, puis les vaccins sous-unitaires protéiques, une nouvelle génération de vaccins, les vaccins ADN est en cours de développement ainsi que des parasites génétiquement modifiés qui présentent un intérêt non seulement en vaccination mais aussi dans la recherche sur la pathogénicité et la virulence du parasite.

I- Les vaccins vivants :

I-1 Souches atténuées (mutations non identifiées)

Des souches atténuées de *Toxoplamsa gondii* ont été utilisées comme candidats vaccins contre la toxoplasmose chez les ovins (Araujo 1994; Buxton and Innes 1995). Seule la souche S48 a été commercialisée. Cependant, bien que efficaces, ces vaccins vivants ne sont pas utilisables chez l'homme du fait que le parasite peu retrouver sa virulence.

I-1-1 La souche ts4

La souche ts-4 thermosensible de *T. gondii*, a été une des premières souches testée en vaccination en modèle murin. L'immunisation de souris par les voies sous-cutanée ou intra-intestinale par la souche ts4 protège les souris immunisées contre une infection par voie systémique avec la souche M7741 de *T. gondii*, ainsi que contre une infection orale avec la souche ME49. Cependant, la protection en terme de kystes cérébraux reste partielle (McLeod *et a*l., 1988). La résistance de souris BALB/c à une épreuve létale après vaccination par voie intrapéritonéale avec la souche ts-4 serait dépendante de l'IFN-

γ (Gazzinelli *et al*., 1991). Cette production d'IFN-γ utilise deux voies, dépendante et indépendante de l'IL-12 (Scharton-Kersten *et al*., 1996).

I-1-2- La souche incomplète S48 de *T. gondii*

Le seul vaccin vétérinaire commercialisé contre la toxoplasmose est utilisé pour la vaccination de brebis en Nouvelle Zélande, en Irlande et en Grande Bretagne. Cette vaccination utilise les tachyzoïtes de la souche incomplète S48 de *T. gondii*, qui a perdu la capacité de former des kystes tissulaires. Les brebis vaccinées par voie sous-cutanée présentent une multiplication des tachyzoïtes au niveau des ganglions lymphatiques locaux ayant pour conséquence des pics fébriles. La réponse humorale est maximale aux alentours de la sixième semaine après immunisation. L'immunité à médiation cellulaire induite par ces vaccins fait intervenir aussi bien les cellules T CD4+ que CD8+ ainsi que la sécrétion de l'IFN-γ (Buxton and Innes 1995). Une protection de 75% des agneaux est observée après vaccination sous-cutanée et infection d'épreuve par voie orale (oocystes de *T. gondii*) des brebis durant la gestation (Buxton, Thomson et al. 1991; Buxton and Innes 1995). Cette souche vaccinale présente certains inconvénients : (i) sa durée de conservation est très brève (2 à 3 semaines), mais surtout la potentialité de la souche à former des kystes n'est pas exclue, (ii) elle ne peut être manipulée par des personnes à risques (femmes enceintes et immunodéprimés) et (iii) la viande de mouton récemment vacciné ne peut être consommée en raison de la possibilité de transmission des tachyzoïtes.

I-1-3-La souche T-263

La vaccination des chats, hôtes définitifs, permettrait de limiter la contamination de l'environnement par des oocystes virulents. Des essais de vaccination en administrant par voie orale des bradyzoïtes ou des kystes de la souche T-263, incapable de former des oocystes, ont été testés. Une diminution de 85 % de la formation d'oocystes a été observée chez les chats vaccinés ((Frenkel, Pfefferkorn et al. 1991; Mateus-Pinilla, Dubey et al. 1999). Ces résultats, bien que très encourageants, ne permettent pas d'envisager une campagne de vaccination à grande échelle des chats, y compris des chats errants, notamment par la nécessité de produire à grande échelle une quantité suffisamment importante de bradyzoïtes.

I-2- Souches atténuées par invalidation de gènes identifiés

I-2-1 La souche RH invalidée pour le gène de la carbamoyl phosphate synthétase II

L'injection, par voie intrapéritonéale, de tachyzoïtes de la souche RH invalidés pour le gène de la carbamoyl phosphate synthétase II, à des souris BALB/c, confère une protection au long terme contre une réinfection par voie intrapéritonéale avec des tachyzoïtes de la souche RH (Fox & Bzik, 2002).

I-2-2 La souche RH invalidée pour les gènes MIC1 et MIC3

L'injection, par voie intrapéritonéale, de tachyzoïtes de la souche RH invalidés pour les gènes MIC1 et MIC3, protéines de micronèmes impliquées dans la phase initiale de l'invasion, à des souris Swiss femelles, confère une protection très efficace contre la phase chronique de l'infection après épreuve orale avec des kystes de la souche 76 K (réduction de 96% du nombre de kystes cérébraux). Une protection significative contre la toxoplasmose congénitale a également été obtenue. Une survie de 100% est observée chez les souriceaux nés des mères vaccinées, alors que 40% des souriceaux nés de mères témoins infectés meurent. Les souriceaux nés des mères vaccinées ont une charge parasitaire très faible par rapport aux souriceaux nés de mères témoins infectées (réduction de 91% du nombre de kystes cérébraux pour 45% d'entre eux et de plus de 96% pour les 55% restants) (Ismael, Dimier-Poisson et al. 2006).

Des expériences réalisées sur brebis montrent également que le toxoplasme invalidé a un fort potentiel immunisant et protecteur contre la toxoplasmose abortive. L'administration du vaccin par voie sous-cutanée à la dose vaccinale de 10^5 tachyzoïtes par brebis induit une augmentation de la température corporelle sans modification du comportement des animaux. Une réponse humorale sérique de type IgG, à long terme spécifique de l'antigène toxoplasmique, est obtenue ainsi qu'une lymphoprolifération sérique spécifique. Les brebis vaccinées et infectées à mi-gestation par 400 oocystes de la souche PRU par voie orale sont protégées totalement contre les avortements précoces liés à l'hyperthermie conséquence de la parasitémie. La vaccination par le toxoplasme invalidé permet également de réduire de manière significative les épisodes d'avortements tardifs. Les résultats obtenus montrent en effet une protection de 60 à 90% selon les expériences

contre une absence totale de protection chez les brebis non vaccinées infectées (Mevelec et al, soumis).

II- Les vaccins à ADN

II-1- Introduction

En 1990 Wolff et al montrent que l'injection d'ADN nu sous une forme plasmidique dans le muscle strié aboutissait à l'expression de la protéine correspondante dans les myocytes du lieu d'injection (Wolff, Malone et al. 1990). Par ailleurs, l'injection intramusclaire induit une réponse humorale et cellulaire contre la protéine codée à partir de l'ADN plasmidique. En 1993, Ulmer et al ont montré que le gène codant pour la nucléoprotéine du virus de la grippe (influenza A) stimulait la prolifération des lymphocytes T cytotoxiques et protégeait les souris vaccinées d'une infection létale (Ulmer, Donnelly et al. 1993). Depuis cette description l'ADN nu a été utilisé dans plusieurs essais cliniques. Récemment, trois vaccins vétérinaires ont obtenu une autorisation de mise sur le marché en Amérique du Nord : un vaccin dirigé contre le virus de la fièvre du Nil chez le cheval, un vaccin dirigé contre le virus de la nécrose hématopoïetique infectieuse chez le saumon d 'élevage et un vaccin dirigé contre le mélanome malin canin.

II- 2- Le principe de construction d'un ADN nu :

L'ADN plasmidique est le plus simple des vecteurs de transfert de gènes. D'une façon générale l'ADN est préparé et amplifié dans les bactéries recombinantes *Escherchia coli*. L'ADN plasmidique contient un ou plusieurs gènes eucaryotes d'intérêt ou un mini-gène codant pour un ou plusieurs épitopes antigéniques d'une ou plusieurs protéines données, insérés dans un site de clonage prévu à cet effet. Le plasmide contient l'origine de réplication *ori* de la bactérie (par exemple *ColE1*). Il n'y a pas d'origine eucaryote pour éviter toute réplication dans les cellules de l'hôte vacciné. Le gène codant pour un antigène est sous le contrôle d'un promoteur eucaryote fort (promoteur viral en général, par exemple le promoteur CMV du cytomégalovirus). Un promoteur spécifique du tissu cible d'injection peut également être utilisé. Le codon d'initiation de la traduction doit être dans le contexte défini par Kozak. En aval du promoteur et avant le gène d'intérêt

l'ajout (non systématique) d'un intron augmente l'expression de l'antigène. En aval du gène d'intérêt se trouve un signal de polyadénylation (séquence de polyadénylation du SV40 ou le plus souvent celle de l'hormone de croissance bovine) afin d'ajouter la queue polyA pour stabiliser l'ARN messager. Un gène de résistance à un antibiotique (exemple la Kanamycine, l'ampicilline n'est pas envisageable pour une utilisation chez l'homme) est présent dans la construction et permet de faire la sélection chez la bactérie. Après culture des bactéries transformées par la construction plasmidique, l'ADN plasmidique est purifié (souvent plusieurs milligrammes) et dissout dans une solution saline pour injection.

III- Les voies d'administration

Plusieurs voies d'administration de l'ADN nu sont possibles. Les voies d'administration les plus utilisées sont les voies intradermique et intramusculaire.
L'expression de l'ADN nu nécessite l'entrée dans la cellule et le transport vers le noyau. L'entrée dans la cellule se fait par un mécanisme actif qui requiert un ou plusieurs récepteurs, les charges négatives de l'ADN sont un facteur important dans cette étape (Levy, Barron et al. 1996; Budker, Budker et al. 2000; Wheeler, Cortez-Gonzalez et al. 2006). Certaines séquences spécifiques pourraient être impliquées et seraient spécifiques du type cellulaire (Lehmann and Sczakiel 2005). Le mode d'internalisation de l'ADN impliquerait la macropinocytose (Basner-Tschakarjan, Mirmohammadsadegh et al. 2004; Wittrup, Sandgren et al. 2007). L'observation que près de 90% de l'ADN injecté par voie intramusculaire ou dans la peau est dégradé par les nucléases dans le milieu extracellulaire dans les 90 min qui suivent l'injection (Barry, Pinto-Gonzalez et al. 1999), souligne la nécessité d'améliorer l'étape d'entrée des plasmides dans la cellule. Pour cela, deux stratégies ont été développées :

III-1- La voie intradermique : technique biolistique (le pistolet à gène)

Il s'agit d'un moyen physique de transfert d'un acide nucléique exogène. Les ADN sont adsorbés sur des microparticules d'or (environs 1 à 3 microns) et projetés à l'aide d'un gaz sous pression. La pénétration cellulaire est la conséquence directe de la vitesse importante d'éjection. Dans la cellule, l'ADN est relâché dans le cytoplasme puis exprimé. Cette forme d'administration présente plusieurs avantages :

- délivrance d'une grande quantité d'acides nucléique dans un tissu
- possibilité d'injecter de l'ADN de grande taille (cosmides ou chromosomes artificiels)
- absence d'effet cytopathique.

La peau est l'organe cible type car facilement accessible.

III-2- La voie intramusculaire : électrotransfert d'ADN

L'électroporation est une technique qui permet la transfection de l'ADN dans une cellule *in vitro*. Cette approche classique a été étendue à la transfection de l'ADN *in vivo*. Après avoir injecté l'ADN par voie intramusculaire par exemple, des impulsions électriques sont administrées à l'aide d'électrodes externes placées de part et d'autre du site d'injection. L'ADN pénètre dans la cellule par perméabilisation de la membrane et par mobilité. Le muscle est la cible la plus simple en effet les cellules musculaires sont faciles d'accès, capturent efficacement l'ADN et permettent une expression prolongée de l'antigène.

IV- La stimulation du système immunitaire par les vaccins ADN

Contrairement aux vaccins sous-unitaires, les vaccins ADN induisent une réponse médiée par les lymphocytes T cytotoxiques. En effet, l'antigène synthétisé *in situ,* au même titre que des protéines virales, peut être remanié par le protéasome et présenté, comme une protéine endogène, par l'intermédiaire des molécules du CMH de classe I. Cette présentation stimule une réponse de type cytotoxique spécifique, souvent nécessaire à l'élimination de pathogènes intracellulaires (Ulmer, Donnelly et al. 1993; Fuller and Haynes 1994; Yokoyama, Zhang et al. 1995; Zarozinski, Fynan et al. 1995), mimant ainsi les vaccins vivants atténués, mais sans présenter de risques de réversion.

Les vaccins ADN injectés par voie intra-musculaire transfectent principalement des myocytes. Cependant, l'ablation du site d'inoculation 10 min après l'injection intramusculaire de l'ADN n'affecte pas la réponse immunitaire (humorale ou T cytotoxique), que l'antigène exprimé soit membranaire, intracellulaire ou sécrété (Torres, Iwasaki et al. 1997). Cela indique que des cellules autres que des myocytes sont transfectées et produisent de l'antigène notamment des APC (Casares, Inaba et al. 1997;

Chattergoon, Robinson et al. 1998). Le rôle majeur des myocytes transfectés est la production de l'antigène y compris dans le cas ou l'antigène exprimé est cytosolique. L'investigation de l'origine des cellules présentant l'antigène à la suite d'une vaccination génique par voie intramusculaire s'appuie sur des expériences de transfert de cellules. Des souris irradiées d'haplotype H-2^{bxd}, ayant reçu des cellules de moelle osseuse de souris d'haplotype H-2^{b} ou H-2^{d}, développent suite à une immunisation intramusculaire une réponse T cytotoxique spécifique restreinte par le CMH de la souris donneuse (Corr, Lee et al. 1996; Fu, Ulmer et al. 1997; Iwasaki, Torres et al. 1997). Ces résultats indiquent que l'antigène est présenté via les molécules du CMH de classe I par les APC d'origine médullaire. La présentation de l'antigène par les APC d'origine médullaire ne nécessite pas leur transfection par le plasmide vaccinant (Ulmer, Deck et al. 1996; Fu, Ulmer et al. 1997). Le mécanisme expliquant la capacité de l'APC à présenter aux lymphocytes T cytotoxiques un antigène produit par le myocyte est la présentation croisée ou cross-priming (Donnelly, Liu et al. 2000; Liu, Swenson et al. 2003). La réponse T auxiliaire implique l'acquisition de l'antigène par les APC (le myocyte n'exprime pas les molécules de classe II). L'antigène peut être sécrété dans le milieu extérieur par le myocyte ou être libéré dans le milieu extérieur (ou ses fragments dégradés) lors de la lyse du myocyte.

Les APC directement transfectées sont capables de présenter l'antigène via les molécules du CMH de classe I et d'induire directement la stimulation des lymphocytes T cytotoxiques CD8+ (Donnelly, Liu et al. 2000; Liu, Swenson et al. 2003). Elles peuvent également présenter l'antigène via les molécules du CMH de classe II et induire la stimulation des lymphocytes T auxiliaires CD4+ (Donnelly, Liu et al. 2000).

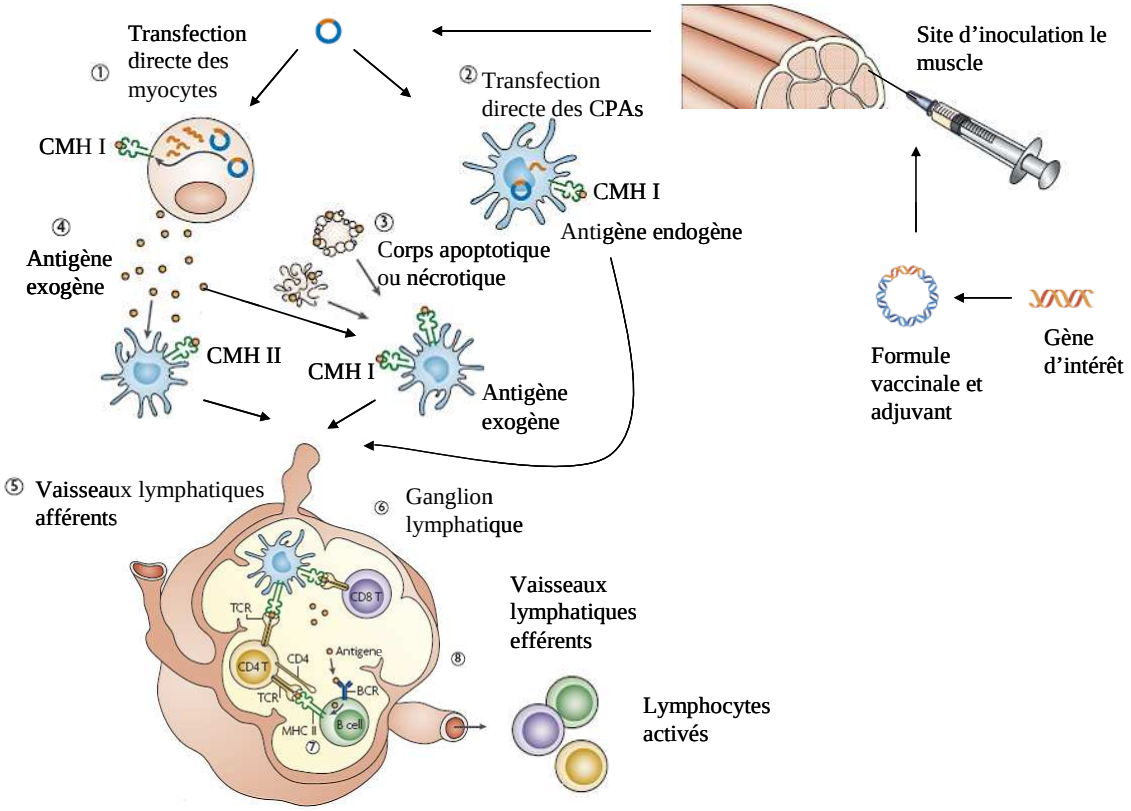


Fig15: L'induction d'une immunité cellulaire et humorale par la vaccination ADN (d'après Kutzler et *al*, Décembre 2008)

Par ailleurs, les séquences non méthylées riches en CpG appelées *immunostimulatory sequence* (ISS) portées par le plasmide jouent le rôle d'adjuvant. Elles sont reconnues par le TLR-9 (Toll like-receptor 9) impliqué dans les réactions immunitaires non spécifiques. Les ISS ont pour effet, en particulier, d'augmenter *in vivo* la sécrétion des cytokines IL-12, IL-6, et IFN-γ par les lymphocytes et les macrophages mais aussi par les cellules dendritiques (Liu and Ulmer 2000). Le fait que les motifs CpG induisent une réponse auxiliaire Th1 pourrait expliquer que les vaccins à ADN induisent préférentiellement une forte réponse lymphocytaire de type Th1 plutôt que Th2 (Liu and Ulmer 2000).
Parallèlement une réponse humorale se met en place, les antigènes sécrétés induisent généralement une plus forte réponse que l'antigène cytosolique (Boyle, Koniaras et al. 1997; Inchauspe, Vitvitski et al. 1997; Drew, Lightowlers et al. 2000; Strasser, Arnold et al. 2000; Ferreira, Miyaji et al. 2006).

V- Avantages et inconvénients du vaccin ADN

L'ADN vaccin est prometteur et présente beaucoup d'avantages et quelques inconvénients

V-1- Avantages de la vaccination ADN

- Un coût faible inférieur au coût de production des vaccins sous-unitaires entre autre du fait qu'ils n'ont pas besoin d'une chaîne de froid pour conserver leur efficacité.
- Facilité de fabrication remarquable par rapport aux vaccins sous-unitaires puisque toute molécule pouvant être fabriquée par recombinaison peut être utilisée pour la vaccination à ADN.
- Stabilité
- Absence d'infection
- Possibilité d'injecter plusieurs plasmides contenant des gènes différents issus du même microorganisme ou de microorganismes différents, avec éventuellement des plasmides codant pour des adjuvants.
- Les ISS jouent le rôle d'adjuvant.
- Possibilité d'effectuer des injections de rappel (Robinson and Pertmer 1998).

V-2- Inconvénients de la vaccination ADN

- La synthèse d'une protéine d'un organisme procaryote par une cellule eucaryote peut mener à des modifications post-traductionnelles qui sont différentes de celles de l'antigène natif issu du microorganisme. Ces modifications peuvent être impliquées dans l'immunogénicité de l'antigène. Ceci concerne essentiellement les microorganismes qui ne sont pas des eucaryotes. Cependant bien que le parasite *T.gondii* soit eucaryote le génome de celui-ci peut comporter des signaux pour la machinerie cellulaire commandant la glycosylation dans des cellules de mammifères alors que la protéine parasitaire native n'est pas glycosylée (pour exemple la protéine SAG1).
- Formation d'anticorps anti-ADN ou risque d'auto-immunité ; cependant en modèle animal ce phénomène n'a jamais était mis en évidence.
- Possibilité de l'induction d'une tolérance chez l'animal nouveau-né.
- Risque potentiel d'intégration de l'ADN dans le génome qui peut mener à la transformation cancéreuse de la cellule transfectée au cas ou l'intégration se ferait dans ou à proximité d'une séquence oncogène. En 1995, des études ont montré qu'un tel risque d'intégration s'avérait être 1000 fois plus faible que celui d'une mutation spontanée dans un génome de mammifère (Nichols, Ledwith et al. 1995) et une telle fréquence ne pouvait vraisemblablement pas être considérée comme dangereuse pour l'hôte. Cependant, des études plus récentes ont démontré ce risque d'intégration par l'injection intramusculaire d'un plasmide contenant le gène de l'érythropoïétine murine, suivie d'une électroporation chez la souris, qui multiplie le taux de transfection entre 6 et 34 fois (Wang, Troilo et al. 2004).

VI -La vaccination ADN contre le toxoplasme

VI-1- Les essais de vaccination ADN avec le gènes codant pour les protéines de surface :

La protéine SAG1 est le candidat vaccin le plus étudié. SAG1 est un antigène majeur de surface du tachyzoïte qui stimule les réponses humorale et cellulaire à la fois chez l'homme et la souris (Khan, Eckel et al. 1988; Chardes, Bourguin et al. 1990; Chardes, Velge-Roussel et al. 1993). Plusieurs essais vaccinaux ont été réalisé avec la protéine purifiée ou recombinante ainsi qu'avec des peptides dérivés de SAG1 (pour exemples :

(Darcy, Deslee et al. 1988; Bulow and Boothroyd 1991; Debard, Buzoni-Gatel et al. 1996; Letscher-Bru, Villard et al. 1998). Plus récemment des essais de vaccination ont été effectués sous forme de vaccin ADN. L'immunisation par ADN induit une réponse à la fois cellulaire et humorale associée à une protection variable selon les modèles. Un essai d'immunisation chez des souris BALB/c avec SAG2, par voie intramusculaire, n'a pas conduit à une protection significative après challenge avec une dose létale de tachyzoïtes de la souche RH (Cui, He et al. 2008).

Présentation de quelques essais de vaccination ADN par SAG1

Souris	Immunisation	Epreuve	Protection Toxoplasmose acquise aiguë	chronique	Protection Toxoplasmose congénitale Transmission maternofeotale	Références
			%survie*	%réduction de kystes cérébraux		
C3H BALB/c	i.m 2x sur 3 semaines avec 100µg	i.p tachyzoïtes RH	100% (T:30%) transfert CD4+: 0% transfert CD8+: retard de mortalité. 80% (T :20%)			Nielsen *et al* 1999 Infect.Immun., 67 :6358-63
BALB/c	i.m 2x sur 3 semaines avec 100µg	v.o 20 kystes Beverley	70% (T :25%)	40%	Pas de protection	(Couper, Nielsen et al. 2003)
BALB/c C57BL/6	i.m 50µg v.cutanée (gen gun 2µg)	v.o kystes Fukaya		40% 20%		(Mohamed, Aosai et al. 2003)
C57BL/6	i.m 2x sur 3 semaines avec 100µg	v.o kystes 76K	62% (T:0%)			(Mevelec, Bout et al. 2005)

(*) survie 20 jours à 1 mois après infection

VI-2- Les essais de vaccination ADN avec les gènes codant pour les protéines de granules denses

Ces protéines stimulent les réponses humorale et cellulaire à la fois chez l'homme (Fatoohi, Cozon et al. 2002; Beghetto, Spadoni et al. 2003) et la souris (Chardes, Velge-Roussel et al. 1993; Gatkowska, Hiszczynska-Sawicka et al. 2006; Frickel, Sahoo et al. 2008). La encore les protections sont variables. Pour GRA1, la protection contre la phase aiguë est médiée par les lymphocytes T CD8+ cytotoxiques (Scorza, D'Souza et al. 2003).

Souris	Immunisation	Epreuve	Protection Toxoplasmose acquise		Références
			Aiguë	chronique	
			%survie**	%réduction de kystes cérébraux	
C57BL/6 BALB/c C3H	i.m 3x sur 3 semaines avec 100µg de pGRA1*	v.o kystes IPB-G	30% (T :20%) 0% (T :0%) 70% (T :10%)	54%	Vercammen *et al* 2000 Infect. Immun., 68, 38-45
C3H	i.m 3x sur 3 semaines avec 100µg de pGRA1*	v.o kystes IPB-G	75% (T :0%) déplétion CD8+ : 25% déplétion CD4% : 100%	73% - 0%	Scorza *et al* 2003 Infect. Immun., 71, 309-316

(*) plasmide portant le gène de GRA1

(**)survie 20 jours à 1 mois aprés infection

Souris	Immunisation	Epreuve	Protection Toxoplasmose acquise		Références
			aiguë	chronique	
			%survie**	%réduction de kystes cérébraux	
C57BL/6	i.m 3x sur 2 semaines avec 100µg de pGRA4*	v.o kystes 76K	60 (T0%)		(Desolme, Mevelec et al. 2000)
C3H	i.m 3x sur 3 semaines avec 100µg de pGRA4*	v.o kystes Me49		40%	(Martin, Supanitsky et al. 2004)

(*) plasmide portant le gène de GRA4

Souris	Immunisation	Epreuve	Protection Toxoplasmose acquise aiguë	chronique	Références
			%survie**	%réduction de kystes cérébraux	
C57BL/6 BALB/c C3H	i.m 3x sur 3 semaines avec 100µg de pGRA7*	v.o kystes IPB-G	10% (T:20%) 5% (T :0%) 90%(T :10%)	63%	Vercammmen *et al* 2000, Infect. Immun., 68,38-45

(*)plasmide portant le gène de GRA7

(**)survie 20 jours à 1 mois aprés infection

VI-3- Les essais de vaccination ADN avec les gènes codant pour les rhoptries

Les essais d'immunisation concernent essentiellement ROP2. ROP2 stimule les réponses humorale et cellulaire chez l'homme (Saavedra, Becerril et al. 1996; Martin, Arcavi et al. 1998). Les protections observées dépendent étroitement du modèle utilisé et plus particulièrement du fond génétique des animaux. Une protection significative est observée uniquement chez les souris C3H et uniquement après épreuve avec une souche de faible virulence. Ces souris développent une réponse humorale et cellulaire de type 1.

Souris	Immunisation	Epreuve	Protection Toxoplasmose acquise aiguë	chronique	Références
			%survie**	%réduction de kystes cérébraux	
C57BL/6 BALB/c C3H	i.m 3x sur 3 semaines avec 100µg de pROP2*	v.o kystes IPB-G	15% (T:20%) 20% (T:0 %) 90%(T:10%)	67%	Vercammmen *et al* 2000, Infect. Immun. 68,38-45
C57BL/6 BALB/c CBA/J	i.m 3x sur 3 semaines avec 100µg de pROP2*	s.c tachyzoïtes RH	0% (T :0%) 0% (T :0%) : délai mortalité 0% (T :0%)		Leyva *et al* 2001, Parasitol. Re., 87, 70-9.

(*) plasmide portant le gène de ROP2

(**) survie 20 jours à 1 mois après infection

VI-4- Les essais de vaccination ADN avec les gènes codant pour les protéines de micronèmes :

Les protéines de micronèmes sont impliquées dans l'étape initiale de l'invasion cellulaire. Les protéines de micronèmes stimulent les réponses humorale et cellulaire chez l'homme (Beghetto, Nielsen et al. 2005; Buffolano, Beghetto et al. 2005). Les souris immunisées avec MIC3 ou AMA1 développent une réponse humorale et cellulaire de type I associée à une réduction de la charge parasitaire en infection chronique (Ismael, Sekkai et al. 2003) pour les souris CBA/J immunisées avec MIC3 et associée à une survie augmentée pour les souris BAL/C ou C57BL/6 immunisées avec AMA1 (Dautu, Munyaka et al. 2007).

Souris	Immunisation	Epreuve	Protection Toxoplasmose acquise		Références
			aiguë	chronique	
			%survie	%réduction de kystes cérébraux	
CBA/J	i.m 3x sur 2 semaines avec 50µg de pMIC3*	v.o kystes 76K		57%	(Ismael, Sekkai et al. 2003)

(*)plasmide codant pour le gène de mic3

VI-5- Les essais de vaccination avec les gènes de heat choc protein (HSP70 et HSP30/BAG1)

Les protéines de choc thermiques (HSP : Heat Shock Protein) ont également été proposées comme candidat vaccin. La protéine TgHSP30 est exprimée par les bradyzoïtes et la protéine TgHSP70 est exprimée par les tachyzoïtes. TgHSP70 a été idenfitiée comme un facteur de virulence du parasite (Mun, Aosai et al. 2000). L'immunisation de souris impliquant la protéine HSP30 du parasite induit une protection significative après une infection avec la souche avirulente Fukaya de *T. gondii* mais aussi avec la souche virulente RH alors qu'une immunisation, dans les mêmes conditions expérimentales, avec la protéine parasitaire HSP70 n'a aucun effet (Mun, Aosai et al. 1999). Cependant, dans le cadre d'une vaccination ADN, la TgHSP70 confère une meilleure protection que la TgHSP30 (Mohamed, Aosai et al. 2003; Dautu, Munyaka et al. 2007). Mohamed et *al* ont

montré que la protection est dépendante de l'IFN-γ, puisque des souris BALB/c K.O. pour l'IFN- γ immunisées avec le gène TgHSP70 en intradermique ne résistent pas à une infection par voie orale avec des kystes de la souche Fukaya de *T. gondii* et meurent en une semaine (Mohamed, Aosai et al. 2003).

HSP70

Souris	Immunisation	Epreuve	Protection Toxoplasmose acquise		Références
			aiguë	chronique	
			%survie	%réduction de kystes cérébraux	
BALB/c C57BL/6 (B6)	i.m 3x 50µg v.cutanée (gene gun) 2µg de pHSP70*	v.o kystes Fukaya		i.m 70% v.c 75% i.m 62% v.c 70%	(Mohamed, Aosai et al. 2003).

HSP30 (BAG1)

Souris	Immunisation	Epreuve	Protection Toxoplasmose acquise		Références
			aiguë	chronique	
			%survie	%réduction de kystes cérébraux	
BALB/c C57BL/6 (B6)	i.m 3x 50µg v.cutanée (gene gun) 2µg	v.o kystes Fukaya		i.m 30% v.c 50% i.m 35% v.c 35%	(Mohamed, Aosai et al. 2003).

VII- Optimisation de la vaccination ADN contre le Toxoplasme :

Des essais d'optimisation de vaccins ADN ont été décrits par plusieurs auteurs, basées essentiellement sur l'utilisation des cytokines comme adjuvants dont le rôle est de costimuler le système immunitaire tel le GM-CSF (Ismael, Sekkai et al. 2003) ou l'IL-12 (Cui, He et al. 2008), l'optimisation de la présentation aux lymphocytes par ubiquitination afin d'orienter la présentation antigénique vers une présentation via le CMH classe I et activer de ce fait les lymphocytes T CD8+ (Ishii, Hisaeda et al. 2006), la vaccination multigénique (Xue, He et al. 2008), avec la construction de chimères (Jongert, Verhelst et al. 2008), par le choix de la voie d'immunisation (Mohamed, Aosai et al. 2003) ou encore

la vectorisation (Qu, Wang et al. 2008). Seuls les essais de vaccination utilisant le GM-CSF seront évoqués ci-dessous :

Le GM-CSF est une cytokine impliquée dans la croissance et la maturation de monocytes et des cellules dendritiques, c'est la cytokine la plus largement utilisée en vaccination ADN, la co-injection de cette molécule sous forme de plasmide avec l'antigène s'est avérée efficace pour améliorer la vaccination contre le toxoplasme (Ismael, Sekkai et al. 2003).

VII-1- La prévention de la toxoplasmose aiguë

La meilleure protection contre la toxoplasmose aiguë est obtenue suite à l'immunisation des souris avec SAG1 combiné au GM-CSF, cependant cette combinaison n'est efficace que contre une infection orale avec la souche de faible virulence Me49. Suite à l'infection par 1000 tachyzoïtes de la souche RH par voie i.p, toutes les souris succombent à l'infection (Angus, Klivington-Evans et al. 2000).

La combinaison du GM-CSF avec GRA4 en vaccination ADN augmente la protection puisque 62% des souris immunisées par GRA4 survivent à une infection avec la souche 76K de *T.gondii* contre 75% lorsque GRA4 est combiné au GM-CSF (Desolme, Mevelec et al. 2000). De même, des souris immunisées avec SAG1 et GRA4 associés au GM-CSF sont mieux protégées (85% de survie) que des souris immunisées avec SAG1 et GRA4 (75% de survie) (Mevelec, Bout et al. 2005).

Souris	Immunisation	Epreuve	Protection Toxoplasmose aiguë acquise (survie*)	Références
C57BL/6	i.m 3x avec 100µg pSAG1 + 50µg pGM-CSF	v.o 80 kystes Me49	95%	(Angus, Klivington-Evans et al. 2000)
C57BL/6	i.m 3x avec 100µg pSAG1 + 50µg pGM-CSF	i.p 1000 tachyzoïtes RH	0% (pas de protection)	(Angus, Klivington-Evans et al. 2000)
C57BL/6	i.m avec 100µg J5, 14, 28 pGRA4 + 50µg pGM-CSF à J5, 14	v.o 40 kystes 76k	75% contre 62% avec pGRA4 seul	(Desolme, Mevelec et al. 2000)
C57BL/6	i.m avec 50µg pSAG1 + 50µg pGRA4 + 50µg à J5, 14, 28 + 50µg pGM-CSF à J5, 14	v.o 40 kystes 76k	85% contre 75% avec pGRA4+pSAG1	(Mevelec, Bout et al. 2005)

*survie des souris jusqu'à 20 à un mois après infection jours après infection.

VII-2- La prévention de la toxoplasmose chronique

Dans les études où les réponses immunes et la protection ont été comparées avec ou sans le GM-CSF, le GM-CSF augmente à la fois les réponses immunes et la protection.

Souris	Immunisation	Epreuve	Protection Toxoplasmose chronique (% de reduction de la charge parasitaire cérébrale)	Références
C57BL/6	i.m 3x avec 100µg pSAG1 + 50µg pGM-CSF	v.o 20 kystes Me49	71%	(Angus, Klivington-Evans et al. 2000)
Rats (sprague)	i.m 3x avec 100µg pSAG1 + 50µg pGM-CSF	v.o 10000 oocystes VEG	60%	(Angus, Klivington-Evans et al. 2000)
C57BL/6	i.m 100µg pGRA4 à J5, 14, 28 + 50µg pGM-CSF à J5, 14	v.o 40 kystes 76K	50% reduction de charge parasitaire par rapport à pGRA4 seul	(Desolme, Mevelec et al. 2000)
CBA/J	i.m 3x avec 50µg pMIC3 + 50µg pGM-CSF	v.o 70 kystes 76K	71% contre 54% avec pMIC3 seul	(Ismael, Sekkai et al. 2003)
SWISS OF1	i.m avec 50µg pSAG1 + 50µg pGRA4 + 50µg à J5, 14, 28 + 50µg pGM-CSF à J5, 14	v.o 70 kystes 76K	67%	(Mevelec, Bout et al. 2005)

VII-3- La prévention contre la toxoplasmose congénitale

Des études ont cherché à protéger des fœtus d'une toxoplasmose congénitale. Une protection contre la phase chronique, évaluée par une diminution de la charge parasitaire cérébrale, est obtenue chez les souris BALB/c infectées par voie orale avec des kystes de la souche Beverley (Couper *et al*., 2003). Avec le même protocole d'immunisation et d'infection chez des souris BALB/c en gestation, Couper *et al.* n'observent cependant pas de protection contre la transmission maternofoetale de *T. gondii* (Couper, Nielsen et al. 2003).

De même, malgré l'efficacité de la combinaison SAG1 et GRA4 associés au GM-CSF à protéger des souris Swiss OF1 contre une toxoplasmose chronique, cette même combinaison n'est pas très efficace à protéger les souris SWISS OF1 contre une toxoplasmose congénitale (Mevelec, Bout et al. 2005). En effet, si une protection significative contre la mortalité des nouveaux nés chez les souriceaux issus des mères immunisées par voie intramusculaire avec avec SAG1 et GRA4 associés au GM-CSF par rapport aux souriceaux nés de mères infectées en cours de gestation, est observée, les souriceaux sont cependant infectés (Mevelec, Bout et al. 2005). Dans les deux études, des réponses humorale et cellulaire de type I avaient été obtenues suite aux immunisations.

D- Utilisation des TLR comme cible thérapeutique

La compréhension des mécanismes d'action des TLR a permis le développement de deux voies thérapeutiques. La première utilise la stimuation et l'activation des TLR par des agonistes pour les vaccins contre les maladies infectieuses, les allergies et le cancer. La seconde inhibe l'action des TLR dans les pathologies où cette action est néfaste telle que les maladies auto-immunes et les maladies inflammatoires chroniques (Kanzler, Barrat et al. 2007). Nous nous intéressons spécialement à l'utilisation des agonistes de TLR en vaccination prophylactique mais aussi thérapeutique.

I- Utilisation des agonistes de TLR comme adjuvants en vaccination

Une réponse immune optimale aux vaccins dépend de plusieurs facteurs incluant la dose d'antigène, le nombre d'immunisations, l'administration et le type d'adjuvant utilisé. Les antigènes faiblement immunogènes requièrent spécialement l'utilisation d'un adjuvant efficace pour déclancher une réponse immune de type Th1. Comme exemple, l'adjuvant de Freund's est un puissant inducteur de réponse de type Th1, cependant il ne peut être utilisé en vaccination chez l'homme à cause de ses effets secondaires (Bomford 1980). L'hydroxyde d'aluminium approuvé pour l'utilisation humaine, présente l'inconvénient d'induire une réponse de type Th2. Depuis la découverte que l'activation de la voie TLR induit une réponse immune de type Th1, il semblait judicieux d'utiliser les ligands de TLR comme adjuvants candidats en vaccination. En effet, l'utilisation des agonistes des TLR renforce l'immunité humorale et cellulaire. Ces agonistes ont pour cible la cellule dendritique qui fait le pont entre l'immunité innée et l'immunité adaptative. Les défenses contre les pathogènes nécessitent la différenciation de Th en Th1. L'activation intense des TLR permet cette différenciation par l'intermédiaire de la sécrétion de l'IL-12 et augmente l'efficacité des vaccins en renforçant la migration des cellules dendritiques vers les gonglions lymphatiques, l'expression des molécules du CMH, l'accumulation des complexes CMH-antigène à la surface cellulaire et enfin en augmentant l'expression des molécules de costimulation. L'activation des TLR permet également d'augmenter la présentation croisée (cross présentation) par les cellules dendritiques (Datta, Redecke et al. 2003; Seya, Akazawa et al. 2006; Mouries, Moron et al. 2008). Ce mécanisme est très efficace dans les stratégies vaccinales. Les ligands des TLR sont utilisés en tant que adjuvants de vaccins et ont montré une faible toxicité et de

fortes potentialités (van Duin, Medzhitov et al. 2006; Kanzler, Barrat et al. 2007; Essakalli, Atouf et al. 2008). Actuellement deux vaccins contre l'hépatite B utilisant comme adjuvant un agoniste de TLR4 ont été approuvés (Fendrix et Supervax). Un troisième utilisant le TLR9 est en phase III de son développement (Heplisav). Un vaccin contre la papilloma virus (Cervarix) est presque approuvé et utilise un agoniste du TLR4 comme adjuvant. D'autres vaccins sont en cours d'essais, contre l'antrax, la grippe et le virus de l'immunodéficience acquise (VIH) (van Duin, Medzhitov et al. 2006; Kanzler, Barrat et al. 2007; Essakalli, Atouf et al. 2008).

I-1- Exemple 1 d'agoniste de TLR : les agonistes du TLR-4 comme adjuvants vaccinaux

Le monophosphoryl lipide A (MPL) est un ligand de TLR4 dérivé de *Salmonella minnesota*. Il contient une forme modifiée du lipide A (un composant de LPS) (Ribi, Cantrell et al. 1984). Comme le LPS, le MPL induit un profile de cytokines de type Th1 (Henricson, Manthey et al. 1993; Puggioni, Durham et al. 2005). Ce qui est important c'est que le MPL est significativement moins toxique que le LPS, ligand naturel du TLR4. Dans le modèle animal, il a été prouvé que le MPL est un adjuvant vaccinal puissant et non toxique qui confère une immunité protectrice contre les infections avec divers agents pathogènes comme le virus de la grippe, *Listeria monocytogenes*, *Salmonelle enterica* et *Leishmania major* (Persing, Coler et al. 2002; Cluff, Baldridge et al. 2005). De plus, le MPL a reçu l'approbation de la FDA (Food and Drug Administration), sa commercialisation est également permise en Europe en tant qu'adjuvant entrant dans la composition du vaccin contre l'hépatite B (Fendrix) (Thoelen, De Clercq et al. 2001; Bienzle, Gunther et al. 2002). MPL entre dans la composition d'un second vaccin approuvé contre le cancer du col de l'utérus du papillomavirus humain (HPV) (Cervarix, GSK) qui contient des antigènes viraux des souches HPV16 et HPV18 associés à un composant dérivé du MPL (3-O-desacyl-4'-MPL) et à de l'alun. Il a été montré que ce vaccin prévient efficacement les infections au HPV 16/18 (Harper, Franco et al. 2004; Paavonen, Jenkins et al. 2007).

I-2- Exemple 2 d'agoniste de TLR : les agonistes du TLR-9 comme adjuvants vaccinaux

LeTLR9 reconnaît les motifs dinucléotidiques CpG hypométhylés communs aux génomes bactériens (Hemmi et al ; nature 2000, 408 ,740). Les CpG-ODN sont des oligonucléotides synthétiques agonistes du TLR9 dont les ponts phosphodiesters, liant les bases nucléotidiques, ont été remplacés par des ponts phosphorothioates augmentant ainsi leur résistance aux nucléases (Zhao, Matson et al. 1993). L'activation du TLR9 par les CpG hypométhylés de l'ADN ou des oligonucleotides synthétiques (CpG-ODN) induit une forte réponse immune de type Th1 qui inclut la sécrétion d'IFN de type I, l'activation des NK, et une réponse cellulaire T CD8+ (Krieg 2006). La fonction biologique du TLR9 se traduit par la stimulation d'une immunité protectrice dirigée contre un pathogène ou une cellule tumorale. Cette propriété est exploitée pour la mise au point de vaccins prophylactiques ou thérapeutiques contre les infections et les tumeurs.

Du fait de l'expression du TLR9 par des cellules B et les CD plasmacytoïdes, les agonistes du TLR9 se présentent comme des adjuvants particulièrement appropriés pour une utilisation vaccinale afin d'induire une réponse humorale protectrice ainsi qu'une réponse cellulaire T cytotoxique. Le puissant effet adjuvant résulte probablement de l'activité synergique entre l'antigène vaccinal et l'agoniste du TLR9 pour stimuler les lymphocytes B spécifiques de l'antigène (Krieg, Yi et al. 1995) et déclancher une réponse Th1 par la maturation/différenciation des CD-TLR9 dépendantes (Sparwasser, Vabulas et al. 2000). Dans une étude comparative sur l'effet de différents adjuvants dans un modèle murin, il a été montré que le CpG-ODN induit la plus forte réponse Th1 spécifique de l'antigène (Kim, Ragupathi et al. 1999). Le CpG7909 a été utilisé comme vaccin thérapeutique contre le cancer en combinaison avec des antigènes tumoraux recombinants comme le MAGE-A3 ou le HER2 dans le cas d'un mélanome (Krieg 2007). Des essais cliniques en phase III, avec le CpG7907 comme adjuvant en immunothérapie anticancéreuse sont en cours.

Le CpG7907 est utilisé également comme adjuvant de vaccins prophylactiques. L'addition du CpG7907 (VaxImmune) au vaccin contre le virus de l'hépatite B (Engerix-B) a pour conséquence, une réponse humorale anti-HBs rapide et importante (Cooper, Davis et al. 2004). Le CpG7907 est également utilisé comme adjuvant en vaccination contre la grippe (Cooper CL et al vaccine 2006 22 3136), cette dernière étude montre que la faible sécrétion de l'IFN-γ suite à la vaccination par des antigènes de la grippe à faible

dose peut être restaurée par l'utilisation du CpG-ODN comme adjuvant. Ce résultat montre l'intérêt du CpG-ODN pour améliorer l'effet immunogène d'antigènes qui peuvent être toxiques s'ils sont utilisés à fortes doses ou dont la production est coûteuse. Une augmentation de la réponse humorale contre les antigènes de l'hépatite B est également observée lors d' essais cliniques utilisant un autre CpG-ODN (10818 ISS) combiné aux antigènes de l'hépatite B (Heplisav, Dynavax)(Barry and Cooper 2007).

I-3- Exemple 3 d'agoniste de TLR, les agonistes des TLR7/8 comme adjuvants vaccinaux

Les TLR7/8 reconnaissent les ARN simples brin des virus à ARN (Dibold SS et al Science 2004 303 1529 ; Lund J .M, Proc Natl Acad Sci USA 2004 101, 5598). Les imidazoquinolines (imiquimode, IQ et resiquimode, RQ) sont des agonistes synthétiques des TLR7/8 (Hemmi, Kaisho et al. 2002). Ces composés sont capables de moduler les réponses immunes et activent les réponses anti-virales. En effet les IQ sont capables d'induire la production des médiateurs de la réaction inflammatoire tel l'IFN-γ, le TNF-α, l'IL-1, l'IL-6,l'IL-8, l'IL-12 (Testerman, Gerster et al. 1995; Stanley 2002), d'augmenter la maturation des CD, d'augmenter les réponses CD4+ et CD8+ (Thomsen, Topley et al. 2004) et d'augmenter la réponse humorale de type Th1 (IgG2a) en inhibant la production d'anticorps de type Th2 (Vasilakos, Smith et al. 2000). De plus, IQ et RQ sont capables de réorienter une réponse Th2 préexistente vers une réponse Th1 (Vasilakos, Smith et al. 2000). IQ et RQ sont efficaces administrés aussi bien par voie sous-cutanée qu'orale (Vasilakos, Smith et al. 2000).

Bernstein et al ont montré que le traitement par voie sous-cutanée des cochons de guinée avec des imiquimodes (IQ) augmente l'effet protecteur de la glycoproteine HSV-2 utilisée en vaccination contre le virus de l'herpès (Bernstein, Miller et al. 1993). Outre la vaccination protéique, la vaccination ADN représente une stratégie vaccinale alternative. Cependant l'expression du gène peut être faible, dans ce cas la faible quantité d'antigène qui en résulte est incapable de déclancher des réponses immunes suffisamment fortes, l'utilisation d'adjuvants est nécessaire pour augmenter l'efficacité vaccinale. IQ et RQ ont été décrit comme ayant un pouvoir adjuvant intéressant en vaccination ADN en modèle murin (Thomsen, Topley et al. 2004; Zuber, Brave et al. 2004). Ces études de vaccination ADN avec des imidazoquinolines augmentent le recrutement et la maturation des cellules dendritiques, l'activation des cellules CD4+ et CD8+ spécifiques de l'antigène, ainsi que

l'induction de l'expression de l'IFN-γ de même que l'augmentation des titres des IgG2a ce qui suggère la mise en place d'une réponse immune de type Th1 due aux IQ et RQ (Otero, Calarota et al. 2004; Thomsen, Topley et al. 2004). La réponse Th1 induite par les imidazoquinolines fait des IQ et RQ des composés attractifs pour l'utilisation en thérapie anti-cancéreuse. En effet dans un modèle murin qui exprime un cancer mammaire, l'effet vaccinal de l'ADN codant pour l'antigène HER2/neu est significativement amélioré par l'utilisation des IQ comme adjuvant par voie sous cutanée. (Smorlesi, Papalini et al. 2005).

L'imiquimode (Aldara, 3M Pharma) est approuvé pour son utilisation par voie cutanée dans le traitement de carcinomes. Cependant, des effets secondaires ont été observés lors d 'essais cliniques contre l'infection chronique par le virus de l'hépatite C (Pockros, Guyader et al. 2007). Les recherches s'orientent aujourd'hui vers des dérivés des imidazoquinolines (Meyer and Stockfleth 2008).

Tableau 3. Les agonistes de TLRs en cours de développement clinique en tant que adjuvants de vaccins.

Composé	Société	TLR	Phase clinique	Indications	Références
Monophosphoryl lipid A	GlaxoSmithKline plc	4	Preclinique	HPV, HBV, herpes, malaria, EBV, tuberculose, cancer	(Stanberry, Spruance et al. 2002) (Atanackovic, Altorki et al. 2004)
Flagelline	VaxInnate	5	PhaseI	Grippe	(Gahery-Segard, Pialoux et al. 2000)
IC-31	Intercell AG/Statens Serum Institut/Aeras Global TB Vaccine Fondation	9	PhaseI	Tuberculose	(Lingnau, Riedl et al. 2007)
	Novartis AG	9	PhaseII	Grippe	(Lingnau, Riedl et al. 2007)
Vaximmune (CpG-7907)	NIAID Malaria Vaccine Development Branch	9	PhaseI	Malaria	(Parkinson 2008)
	Novartis AG	9	PhaseI	Grippe	(Parkinson 2008)
	Pfizer Inc	9	PhaseII	(cancer du poumon) NSCLC	(Parkinson 2008)
Lipopeptides	French National Agency for AIDS Research	2	PhaseII	HIV	(Parkinson 2008)
ISS-1018	Merck & Co Inc/Dynavax Technologies Corp	9	PhaseIII	HBV	(Halperin, Dobson et al. 2006)
Ampligen	Hemispherx Biopharma Inc	3	Pre-enregistrement	Grippe	(Ichinohe, Tamura et al. 2007)
Amplivax	Orchestra therapeutics Inc	9	Développement interrompu	HIV	(Parkinson 2008)

II- Les antagonistes des TLRs

La réponse immune peut parfois dépasser le but de protéger l'hôte et devenir néfaste. C'est le cas des maladies inflammatoires chroniques telle la polyarthrite rhumatoïde et le lupus érythémateux disséminé. Les thérapeutiques biologiques visaient jusqu'à présent, les cytokines, les récepteurs membranaires cellulaires ou les molécules de costimulation impliquées dans ces pathologies. Ces agents présentent quelques désavantages : réponse variable entre les patients, un coût élevé. L'intérêt s'est porté alors sur les TLR et leurs voies de signalisation (Sweeney and Firestein 2007).

Dans le modèle murin les TLR 7 et 9 ont été impliqués dans le lupus érythémateux (Marshak-Rothstein 2006). Les agents utilisés couramment pour dans le traitement des maladies auto-immunes comme la chloroquine et l'hydroxychloroquine bloquent la signalisation des TLRs ce qui explique leur efficacité (Rutz, Metzger et al. 2004). Ces observations ont conduit au développement d'antagonistes des TLR. L'antagoniste des TLR7/8/9, CpG-52364 est en essai clinique pour le traitement du lupus érythémateux (Meyer and Stockfleth 2008).

Les allergies peuvent activer les TLR, l'utilisation de molécules qui bloquent la signalisation via les TLRs peut être bénéfique dans certaines conditions. A titre d'exemple, l'activation du TLR4 par les endotoxines bactériennes peut aggraver l'asthme (Michel, Kips et al. 1996). Pour cette raison bloquer la voie de signalisation du TLR4 par un antagoniste peut être bénéfique pour prévenir les crises d'asthme. Des études sur modèle murin illustrent ce cas de figure, cependant aucune étude clinique n'a été rapportée à ce jour (Savov, Brass et al. 2005).

Les objectifs

Objectif 1 : L'optimisation de la vaccination ADN contre la toxoplasmose chronique par l'utilisation d'un vecteur bicistronique portant à la fois le gène codant pour l'antigène et le gène codant pour l'adjuvant.

Initialement, l'intérêt du GM-CSF comme molécule adjuvante a été montré par l'équipe de Ertl (1994) dans une stratégie de vaccination génique contre la rage (Xiang and Ertl 1995). Le GM-CSF intervient notamment dans le recrutement, la prolifération et la maturation des cellules présentatrices d'antigènes. Plusieurs essais de vaccination ADN contre la toxoplasmose utilisant comme adjuvant le gène du GM-CSF comme adjuvant ont été décrits dans la bibliographie (Angus, Klivington-Evans et al. 2000; Desolme, Mevelec et al. 2000; Ismael, Sekkai et al. 2003; Mevelec, Bout et al. 2005). Néanmoins, tous ces essais se basent sur la co-inoculation de deux plasmides, un plasmide porteur du gène qui code pour l'antigène candidat vaccin, en plus d'un second plasmide qui code pour le gène du GM-CSF. Cependant plusieurs études suggèrent que pour un meilleur effet adjuvant du GM-CSF celui-ci doit être co-inoculé exactement en même temps et au même moment que l'antigène (Xiang and Ertl 1995; Svanholm, Lowenadler et al. 1997; Barouch, Santra et al. 2002). Ainsi, Barouch *et al*. (2002) ont cloné les gènes codant pour la glycoprotéine Gp120 du VIH et le gène codant pour le GM-CSF dans un plasmide bicistronique (Barouch, Santra et al. 2002). Les séquences des 2 protéines sont clonées en aval d'un promoteur eucaryote et séparées par une séquence IRES d'origine virale. Les protéines sont traduites à partir d'un ARNm unique, la traduction du deuxième gène utilise la séquence IRES (« Internal Ribosome Entry Segment ») qui va permettre la fixation du ribosome sur l'ARNm en amont du deuxième gène pour permettre la traduction de celui-ci selon un mécanisme dit « alternatif ». Ces auteurs ont comparé les réponses immunes induites après immunisation par le plasmide bicistronique (50 µg) avec l'association de 2 plasmides (50 µg de chaque). Ils n'ont pas observé de différence sur la réponse humorale ni sur la présentation CMHI, par contre, la réponse cellulaire proliférative est très largement augmentée avec le vecteur bicistronique et s'accompagne d'une synthèse accrue d'IFN-γ. Par des expériences de déplétion *in vitro*, ils ont montré que cette réponse est due aux cellules T CD4+. Des résultats similaires ont été obtenus par Chow *et a*l (1997) et Lee *et al*. (1998) dans des expériences d'immunisation contre

l'hépatite B et l'hépatite C respectivement (Chow, Huang et al. 1997; Lee, Cho et al. 1998).

Sur la base de ces données nous nous sommes donc proposés d'évaluer et de comparer l'effet protecteur d'une vaccination ADN avec un vecteur bicistronique portant à la fois le gène codant pour l'antigène MIC3 de *T.gondii* et le gène du GM-CSF murin à une vaccination classique qui fait intervenir les gènes de MIC3 et le GM-CSF dans deux plasmides indépendants. Le vecteur bicistronique choisi est le pIRES (Invitrogen), il présente deux sites de clonages multiples qui sont sous le contrôle d'un même promoteur. Le gène *mic3* est cloné au niveau du premier site de clonage tandis que le gène du GM-CSF est cloné au niveau du deuxième site. Les deux sites de clonage multiple sont séparés par une séquence IRES (internal ribosome entry segment) du virus EMCV. La validation du vecteur bicistronique nous permettra par la suite de l'utiliser pour le clonage d'autres gènes de *T.gondii* qui codent pour des antigènes dont on veut étudier le pouvoir immunogène.

Les résultats de ce premier objectif sont intégrés dans le premier article qui porte par ailleurs sur l'étude des réponses immunes impliquées dans la protection conférée par l'antigène MIC3 et les domaines de MIC3 impliqués dans les réponses immunes et la protection. Seule la partie portant sur l'optimisation de l'effet adjuvant du GM-CSF entre dans le cadre de la réalisation des objectifs de la thèse.

Objectif 2 : L'étude des propriétés immunogènes de la profiline de T. gondii dans un modèle de vaccination ADN contre la toxoplasmose chronique.

La profiline des apicomplexes est indispensable pour la motilité, l'invasion cellulaire et la sortie active des parasites de la cellule infectée (Plattner, Yarovinsky et al. 2008). Parallèlement, la profiline de *T. gondii* a la capacité de stimuler les cellules dendritiques conventionelles (CD8+) et les cellules dendritiques plasmacytoïdes à produire de l'IL-12 suite à la reconnaissance de la profiline par le TLR-11 à leur surface (Yarovinsky, Zhang et al. 2005). Yarovinsky et al. ont également montré que les propriétés immunogènes de la profiline sont intimement liées à son effet adjuvant. La profiline de *T. gondii* induit des lymphocytes T CD4+ spécifiques produisant de l'IFN-γ chez la souris après immunisation avec de l'extrait parasitaire ou après infection avec des tachyzoïtes. Cette réponse cellulaire dépend du TLR11 et de la voie de signalisation MyD88. En effet, les cellules T CD4+ issues de souris TLR11-/- ou MyD88 -/-, préalablement immunisées avec l'extrait parasitaire ne prolifèrent pas *in vitro* suite à une stimulation avec des CPA issues de souris sauvages

sensibilisées avec de la profiline, contrairement aux cellules T CD4+ des souris sauvages. Ce pouvoir immunogène se traduit également par la capacité de la profiline à induire une forte réponse spécifique d'un peptide auquel elle est fusionnée. En effet, suite à l'immunisation des souris avec une protéine chimère OVA-profiline, les cellules TCD4+ des souris immunisées sont à l'origine d'une forte réponse immune dirigée contre l'OVA par rapport aux souris immunisées avec le peptide seul ou un mélange profiline/ peptide OVA (Yarovinsky, Kanzler et al. 2006). D'autres auteurs se sont intéressés à la profiline-like de *Eimeria tenella*, qui s'est avérée un puissant inducteur de l'immunité innée, puisque comme la profiline de *T. gondii*, elle stimule la production de l'IL-12 par les cellules dendritiques, ainsi que les médiateurs de la réaction inflammatoire tel l'IFN-γ, l'IL-6, le TNF-α (Rosenberg, Juckett et al. 2005). Toutes ces propriétés ont été décrites malgré la localisation cytoplasmique de la profiline au niveau du parasite ce qui la défavorise pour être un antigène à fort pouvoir immunogène. Notre deuxième objectif a été d'étudier les propriétés immunogènes des profilines de *T. gondii* et de *N. caninum* par vaccination ADN avec le GM-CSF comme adjuvant. La profiline de *N. caninum* a été inclue dans l'étude, du fait de sa très forte homologie avec la profiline de *T. gondii* (93%) et donc de sa capacité potentielle à induire des réponses immunes croisées et par conséquent à conférer une protection contre *T. gondii*. Le potentiel vaccinant de la profiline de *T. gondii* a été évalué dans le cadre d'une vaccination ADN utilisant le GM-CSF comme adjuvant, en optimisant au maximum la disponibilité de l'adjuvant et de l'antigène pour stimuler le système immunitaire. Cette optimisation se traduit par l'utilisation du vecteur bicistronique validé lors des investigations menées dans le cadre de notre premier objectif d'une part et par la construction de deux formes de profiline de *T.gondii* d'autre part, une forme cytoplasmique et une forme sécrétée. Les résultats de cette étude font l'objet du deuxième article.

Objectif 3 : L'étude de l'effet adjuvant de la profiline-like d'*Eimeria tenella* contre la toxoplasmose chronique en modèle murin.

La reconnaissance de la profiline de *T. gondii* ou de *Eimeria tenella* par le TLR-11 active la voie de signalisation MyD88 ce qui a pour effet de déclencher une cascade de réactions intracellulaires qui vont aboutir à la transcription du facteur NF-κB ce qui permet l'expression des cytokines pro-inflammatoires (Rosenberg, Juckett et al. 2005; Yarovinsky, Zhang et al. 2005) et la mise en place d'une réponse immune efficace. L'activation du TLR11 s'inscrit donc dans le schéma de l'activation de la voie des TLR récemment

découverte et qui induit une réponse immune de type Th1 nécessaire à la défense contre divers pathogènes (Kanzler, Barrat et al. 2007). De ce fait, les ligands de TLR ont largement été utilisés dans un but thérapeutique (Parkinson 2008).

L'effet adjuvant de la profiline d'*E. tenella* a été démontré à la fois dans une stratégie de thérapie cancéreuse et contre des infections virales. L'injection de cellules tumorales (jour 0) suivie de l'injection de rEA (0,4ng/souris) pendant 5 jours consécutifs conduit à une réduction très significative des tumeurs, associée à une augmentation de la survie (Rosenberg, Juckett et al. 2005). Une protection significative a été obtenue à la fois dans une stratégie prophylactique et thérapeutique contre le phlébovirus RVFV (Rift Valley fever virus). L'injection de 0,1µg ou 1µg de rEA 4 heures avant et 48 heures après l'infection, conduit à une protection en terme de survie de 100% des souris, alors que seulement 9,5% des souris du lot témoin infecté survivent. Parallèlement le nombre de virus dans le sang et le foie est largement diminué. Le traitement thérapeutique consistant en l'injection de protéine rEA 24 heures après l'infection, conduit à des protections significatives quelque soit la dose de rEA administrée (de 1µg à 1ng). La plus forte réduction du titre viral sérique (et dans le foie) est observée aux doses de 1 et 0,1µg (Gowen, Smee et al. 2006). Le traitement prophylactique contre le flavivirus Banzi, proche du virus de la fièvre jaune, avec la protéine rEA injectée 4 heures avant et 48 heures après l'infection virale aux doses de 1 ou 0,1µg, conduit à une protection significative en terme de survie associée à une diminution significative du nombre de virus dans le cerveau des souris traitées. L'injection simultanée de rEA avec du GM-CSF, de l'IFN-γ, de l'IL-4 et un anticorps anti-CD4, augmente significativement l'effet de rEA (Julander, Judge et al. 2007).

Notre troisième objectif a été d'étudier l'effet adjuvant de la profiline-like d'*Eimeria tenella* en vaccination contre la toxoplasmose chronique chez la souris. Deux voies d'immunisation ont été utilisées, la voie intrapéritonéale utilisée dans les expériences précédentes et la voie nasale.

Les résultats de cette étude font l'objet du troisième article.

Article 1

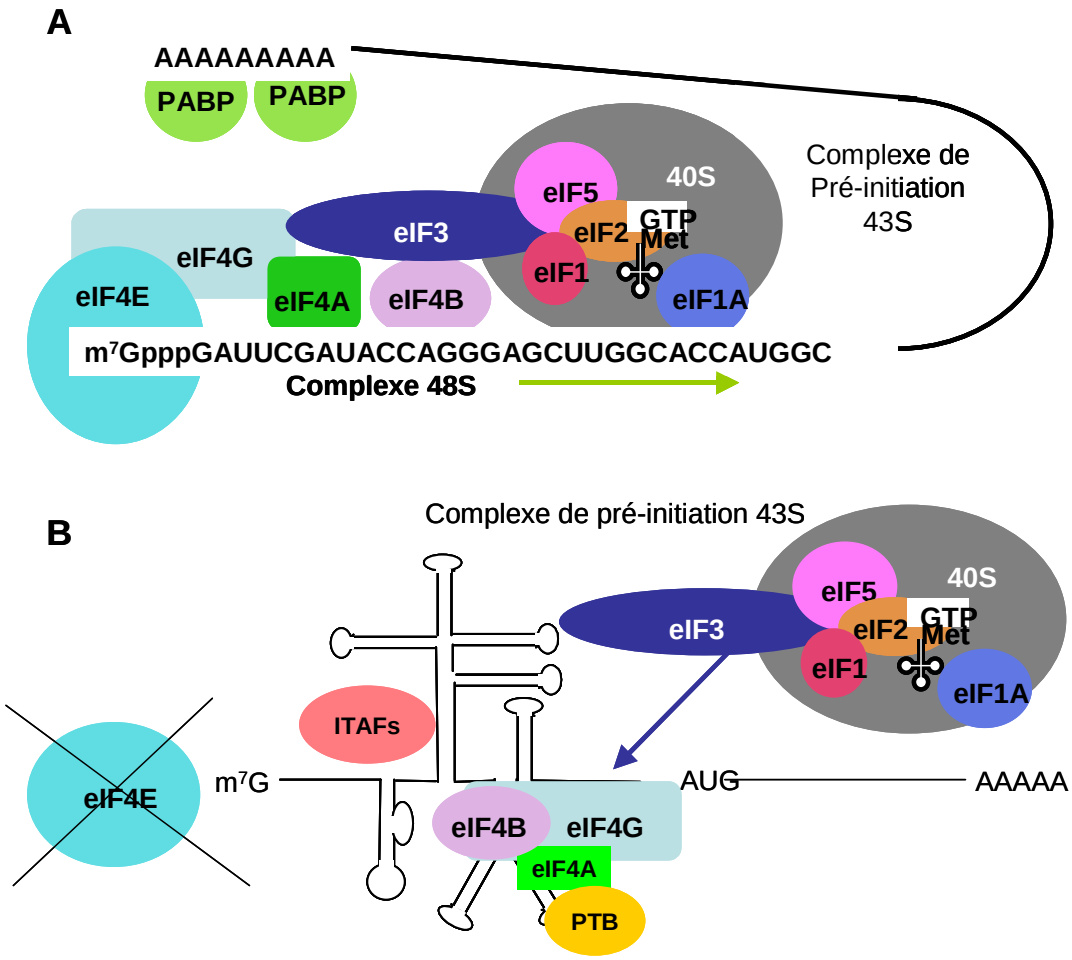
Analyse de la protection induite par la vaccination ADN avec le gène de MIC3. le rôle majeur des lymphocytes TCD4 et lymphocytes TCD8

Introduction

Dans le cadre de la vaccination ADN contre *T. gondii* la co-inoculation d'un plasmide exprimant le GM-CSF avec un plasmide exprimant un antigène du parasite (GRA4, SAG1 ou MIC3) permet de potentialiser les réponses immunes et la protection (Desolme et al, 2000 ; Ismael et al., 2003, Mévélec et al, 2005). Pour être efficace, le plasmide codant pour l'antigène d'intérêt et le plasmide codant pour le GM-CSF doivent être injectés au même endroit et au même moment (Xiang et Ertl, 1995, Immunity; Svanholm *et al*., 1997, Scand. J. Immunol; Barouch *et al*., 2002, *J* Immunol) d'où l'intérêt de faire exprimer l'antigène et le GM-CSF par un plasmide unique. Pour augmenter l'effet adjuvant du GM-CSF le clonage de la molécule adjuvante et de l'antigène (MIC3) a été réalisé dans un vecteur bicistronique (pIRES, Invitrogène). Nous avons choisi de cloner les séquences codant pour MIC3 et pour le GM-CSF dans un vecteur bicistronique, pIRES (Clontech) ou les deux séquences, séparées par une séquence IRES de l'EMCV, sont exprimées à partir d'un même ARNm. Ce vecteur contient deux sites de clonage multiples pour faciliter l'insertion des séquences d'intérêt.

Nous avons cloné la séquence codant pour MIC3 en amont de l'IRES. Nous avons fait ce choix pour nous assurer de l'expression de l'antigène vaccinant. En effet, la traduction dépendant de la coiffe 5' (mécanisme de balayage) de la première séquence insérée n'est pas influencée par la deuxième. Inversement la traduction de la deuxième séquence dépendant de l'IRES (mécanisme dit alternatif) peut être affectée par la première séquence. En effet Hennecke *et al*. (2001) ont observé que l'antigène HBc de l'hépatite B est bien exprimé qu'il soit en première ou deuxième position par rapport à l'IRES alors que les cytokines (IFN-□, IL-7 ou GM-CSF) ne sont bien exprimées qu'en première position. Ils ont confirmé cette observation avec deux gènes codant pour des luciférases (Fluc et Rluc) et avec trois séquences IRES d'origine virale différente dont celle de l'EMCV. La séquence de Fluc a un effet négatif lorsqu'elle est en première position vis-à-vis de la seconde séquence Rluc. Effet qui n'est pas observé avec Rluc. Cet effet négatif de Fluc s'exerce aussi sur le gène CAT. Cependant, ces auteurs ne donnent pas le détail de leurs constructions, notamment la position précise du codon d'initiation de la traduction de la deuxième séquence.

En effet, tous les IRES des picornavirus dont la structure secondaire est relativement constante (environ 450 nucléotides), ont une séquence polypyrimidique très conservée (Yn) de 5 à 7 nucléotides, du coté 3', à environ 20 nucléotides (Xm) en amont d'un AUG. Les longueurs de Yn et de Xm sont importantes pour la fonction de l'IRES. Les séquences entre Yn et l'AUG varient parmi les IRES des picornavirus, mais la distance entre Yn et AUG est conservée. Dans l'IRES de l'EMCV le codon d'iniation de la traduction est le 11éme (position 834) avec une petite proportion traduite au 12ème AUG, situé 12 nucléotides après. Par contre il n'y a pas d'initiation de la traduction au 10ème AUG qui est 8 nucléotides avant le 11ème et qui pourtant est dans le contexte de Kosak (Jang, 2006). Dans le vecteur pIRES, suite à l'insertion du site de clonage multiple MCSB, les AUG 11 et 12 n'existent plus ils sont remplacés respectivement par CUU et CGG. Pour initier la traduction, l'AUG utilisé est celui apporté par la séquence clonée ce qui augmente la longueur de Xm et a pour conséquence une diminution de la traduction. Dans notre construction, l'AUG de la séquence codant pour le GM-CSF est situé à 45 nucléotides de Yn. Les études d'expression *in vitro* ont montré une expression moindre du GM-CSF (séquence codante placée sous le contrôle de la séquence IRES du plasmide) par rapport à l'expression par un plasmide monocistronique (pcDNA3), expression 26 fois moindre. Une étape d'optimisation qui a consisté à déléter 43 nucléotides en amont du site SmaI en position 1745 dans le site de clonage multiple MCSB a permis d'augmenter cette expression qui reste toutefois huit fois moindre que celle obtenue avec le vecteur monocistronique (dans cette construction Xm=22). L'immunisation comparée de souris avec une faible dose du vecteur bicistronique pIRESopt-MIC3-GMCSF (10µg) et la coinoculation de deux vecteurs monocistroniques (10µg chaque) a montré que les réponses immunes (en particulier la réponse cellulaire) et la protection contre la phase chronique de la toxoplasmose sont meilleures avec le vecteur bicistronique. En effet une protection est observée uniquement chez les souris immunisées avec le vecteur bicistronique par rapport aux souris témoins (57%de réduction du nombre de kystes cérébraux). Dans les travaux présentés dans l'article qui suit, seuls les résultats concernant l'optimisation de l'effet adjuvant du GM-CSF entrent dans le cadre de la réalisation des objectifs de la thèse.



PABP : « polyA binding protein », ElFs : facteurs d'initiation, ITAFs : «IRES- specific cellular transacting factors » (facteurs cellulaires non canoniques), PTB : « polypyrimidine tract binding protein »

Figure 5 : Mécanisme alternatif de traduction : IRES « Internal ribosome Entry Site »

Les ARNm eucaryotes sont traduits selon un mécanisme de balayage (ou scanning) de la séquence nucléotidique par le ribosome. Selon ce modèle, la sous unité ribosomale 43S est recrutée sur l'ARNm via la coiffe en 5', puis elle balaye la région non traduite pour localiser le codon d'initiation (A). L'infection d'une cellule par un picornavirus vise la production d'un plus grand nombre de virions. Pour ce faire, le virus prend le contrôle de la machinerie de synthèse protéique d'une cellule (le ribosome), de manière à transformer la cellule en usine de protéines virales. Cela s'effectue par l'intermédiaire d'un mécanisme alternatif de traduction (indépendant de la coiffe 5') basé sur la formation du ribosome au sein de l'ARNm au niveau d'une séquence IRES (B). Les IRES des picornavirus sont longs d'environ 450 nucléotides, et structurés en différents domaines particulièrement stables (pour revue Jang, 2005).

Further Analysis of Protection Induced by the MIC3 DNA Vaccine. A Major Role of CD4 and CD8 T Cells

Alaa Bassuny Ismael[1], Dorsaf Hedhli[1], Odile Cérède[2], Maryse Lebrun[2], Isabelle Dimier-Poisson[1], and Marie-Noëlle Mévélec[1]*

[1]*Université François Rabelais ; INRA ; UMR 0483 Université-INRA d'Immunologie Parasitaire et Vaccinologie, Biothérapies anti-infectieuses, IFR 136 Agents transmissibles en Infectiologie. UFR des Sciences Pharmaceutiques, 31 avenue Monge, 37200 Tours, France*

[2] *Université de Montpellier ; CNRS ; UMR 5539 Université-CNRS, université de Montpellier 2, 34090 Montpellier, France*

*Corresponding author. Mailing address: UMR Université-INRA d'Immunologie Parasitaire et Vaccinologie, Faculté de Pharmacie, 31 Avenue Monge, 37200 Tours, France. Phone: +33.2.47.36.71.86.
Fax: +33.2.47.36.72.52. E-mail: mevelec@univ-tours.fr

Keywords: *Toxoplasma gondii*; DNA vaccine; MIC3; GM-CSF; CD4 and CD8; EGF; Lectin; bicistronic vector

ABSTRACT

The MIC3 DNA vaccine (pMIC3i) combined with a plasmid encoding the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (pGM-CSF) elicited specific humoral and cellular responses and provided effective protection against the chronic phase of *Toxoplasma gondii* infection in CBA/J mice. In this study, we evaluated the contribution of the cellular and the humoral responses in protection conferred by pMIC3i. The adoptive transfer of $CD4^+$ or $CD8^+$ T lymphocytes from pMIC3i immunized mice to naive mice protected naive mice against parasite challenge. However, the *T. gondii* MIC3-immune serum had no effect on *in vitro* invasion of tachyzoites into cells, suggesting that antibodies may not function protectively *in vivo* by blocking infection of host cells by tachyzoites. We then compared the immunogenicity of plasmids expressing the EGF-like (pEGF) or the lectin-like (pLectin) domains of the MIC3 protein and the protection they elicit against parasite challenge. A specific Th1 cellular immune response was obtained in the CBA/J mice vaccinated with both pEGF or pLectin combined with pGM-CSF. All mice immunized with pEGF combined with pGM-CSF, but not all the mice immunized with pLectin combined with pGM-CSF produced detectable anti-MIC3 IgG antibodies. Mice immunized with any plasmid, even pLectin immunized mice without detectable anti-MIC3 antibodies, displayed significant protection. The protection afforded by MIC3 DNA vaccine is induced by both the EGF and lectin domains and mainly correlates with cell-mediated immunity. Finally, the protective efficacy of MIC3 was further improved by the use of a bicistronic vector.

INTRODUCTION

Toxoplasma gondii, is the causative agent of toxoplasmosis, a life-threatening disease in immunocompromised patients and a potentially severe disease in immunosuppressed patients and congenitally infected children (28, 40). In animals, toxoplasmosis is of great economic importance worldwide due to abortions, stillbirth and neonatal losses in all types of livestock, especially in sheep and goats (3).

Primary infection with *T. gondii* results in the development of both humoral and cell-mediated immune responses and confers long-term protection. This suggests that the development of an effective vaccine is a realistic goal.

Protection against *T. gondii* infection is mainly attributed to cell-mediated immunity (for reviews see: 10, 12). Specific T lymphocytes act either as cytokine producer cells that help infected cells to kill the parasite or as cytotoxic cells that destroy infected cells. Previous studies have shown that both $CD4^+$ and $CD8^+$ T-cell subtypes are involved in the protection (4, 14, 15, 23, 34, 36, 38).

Infection with *T. gondii* also stimulates humoral immunity, both in the digestive tract and serum (7, 26). The role of Abs on resistance against *T. gondii* remained unclear until the use of B-cell-deficient mice by Kang *et* al. (22) and Johnson and Sayles (21). Their results indicated the importance of the B-cell Ab response in preventing persistent proliferation of tachyzoites in the brain and lung during the chronic phase of infection.

In molecular terms, invasion of host cells by *T. gondii* is closely coupled to the release of proteins stored within apical secretory granules known as micronemes, which play a central role in the recognition of and adhesion to host cells (for reviews see, 27, 35). Among these proteins, the protein MIC3 contains adhesive motifs and has been shown to bind to the surface of host cells (13, 5). MIC3 contains five epidermal growth factor-like (EGF) domains and the lectin-like domain required for binding (5).

We have recently demonstrated that *MIC3* of *T. gondii* is a potent and effective vaccine candidate against toxoplasmosis. Thus, the plasmid DNA encoding the immature form of the MIC3 protein combined with pGM-CSF, a plasmid encoding the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, induced strong specific humoral and cellular immune responses, as well as highly effective significant protection against the chronic phase of infection in immunized CBA/J mice, following oral challenge with *T. gondii* cysts (20).

We evaluated the contribution of cellular and humoral anti-MIC3 immune responses to protection induced by intramuscular (i.m.) immunization of CBA/J mice with a combination of pMIC3i and pGM-CSF. We performed the adoptive transfer of $CD4^+$ and $CD8^+$ T lymphocytes from pMIC3i immunized mice to naive ones and the role of humoral immunity was assayed by *in vitro* invasion assays. We also constructed a plasmid encoding the EGF-like domains (pcDNA3.1 EGF "pEGF") and a plasmid encoding the lectin-like domain (pcDNA3.1 Lectin "pLectin") of MIC3, to define which domains are involved in the protection. Furthermore, the adjuvant effect of the GM-CSF-expressing vector required the precise temporal and spatial codelivery of GM-CSF with antigen (2, 39, 42); thus, we constructed a bicistronic plasmid expressing MIC3 and GM-CSF. In conclusion, the protection induced by pMIC3i was mainly mediated by $CD4^+$ and $CD8^+$ T lymphocytes and both EGF and Lectin domains of MIC3 conferred protection. Furthermore, the co-delivery of GM-CSF by bicistronic plasmid appeared to be a most effective way for enhancing the adjuvant properties of GM-CSF.

MATERIALS AND METHODS

Mice. Six-to eight-week-old female CBA/J mice (H-2^k) were obtained from Janvier, Le Genest St Isle, France, and maintained under pathogen-free conditions in our animal house for use throughout these experiments. Experiments were performed in accordance to the rules the Ethic Committee from Tours University.

Parasites. Two strains of *Toxoplasma gondii* (RH and 76K) were used in this study. The RH strain tachyzoites were harvested from the peritoneal fluids of Swiss OF1 mice that had been intraperitoneally infected 3 to 4 days earlier. The 76K strain cysts were obtained from the brains of orally infected CBA/J mice and maintained by monthly passage

.

Preparation of *T. gondii* antigen (TAg). *T. gondii* antigen was prepared from RH strain tachyzoites as previously described (33). Briefly, the tachyzoites were washed and sonicated for three 10 min periods at 60 W/s. The toxoplasma sonicate was centrifuged at 2000g for 30 min. The protein concentration was determined in the supernatant (later used as the source of antigen) by the Micro BCA protein assay reagent kit using bovine serum albumin (BSA) as standard (Pierce, Rockford, USA). The TAg was stored at -80°C until use.

Adoptive transfer of $CD4^+$ and $CD8^+$ T lymphocytes. In adoptive transfer experiments, spleens were aseptically removed at week 6 from 9 mice immunized with either empty plasmid (pcDNA3) or pMIC3i combined with pGM-CSF as previously described (20). Briefly, mice were injected using syringes with $30^1/_2$-gauge needles with 100 µl of cardiotoxin (10 µM): solutions were injected into each tibialis anterior muscle 5 days before DNA immunization, to enhance the uptake of the plasmid DNA (9). On days 0 and 14, the regenerating muscles of these mice were injected with 50 µg pMIC3i alone or combined with 50 µg pGM-CSF, in 100 µl sterile endotoxin-free PBS (50 µl in each muscle) and then boosted on day 28 with 50 µg of plasmid alone. The control group was composed of mice injected i.m. with 50 µg empty plasmid, pcDNA3, three times at 2 week intervals. The spleens were pooled and pressed through a stainless steel mesh. Single-cell suspensions were obtained by filtration through nylon mesh as previously described (20). A positive selection for either $CD4^+$ or $CD8^+$ splenocytes from each group

of mice was performed with a MACS LS^+ separation column (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) according to the manufacturer's instructions. We evaluated the purity of the two subpopulations by flow cytometric analysis (Becton Dickinson; FACScan cytometer) using CellQuest software and monoclonal antibodies, anti-CD4 (L3T4) and anti-CD8a (LY2) (Pharmingen), respectively. We obtained a purity of > 80% for each subpopulation after LS-MACS separation. Naive mice were injected intravenously (i.v.) via the tail vein with 2.10^7 cells in 0.2 ml of phosphate buffered saline (4 groups of 6 mice). Twenty-four hours after cell transfer, the mice were orally challenged with 60 cysts of the 76K strain. The mice were killed one month later.

***In vitro* invasion assay.** The *in vitro* invasion assay was performed as previously described (41). Briefly, 2 x 10^4 BHK-21 cells were seeded in 96-well plates (Costar) in 200 µl of culture medium (GIBCO BRL) supplemented with 5% fetal calf serum (FCS), 2% tryptose, 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin. Plates were incubated for 24 h at 37° in 5% CO_2, 95% humidity. The tachyzoites were incubated for 30 min at room temperature with 1:10 dilution of sera of mice immunized with pMIC3i combined with pGM-CSF or sera of mice immunized with pcDNA3 alone, in cell culture medium. A serum from a *T. gondii*-infected mouse was included as a positive control of inhibition. Parasites were then added to each corresponding well at a 5 : 1, parasite : cell, ratio. After 2h at 5% CO_2 and 37°, 2.5 µCi 5,6-[^{3}H] uracil (specific activity 50 Ci/mmol) were added to each well followed by incubation for 16 h. Host cells and Toxoplasma were lysed by freeze thawing, harvested by aspiration, and were collected on fiberglass filters. Uracil incorporation was measured using a beta counter. The results are expressed as mean cpm (counts per minute) ± SD.

Plasmid construction. Plasmid pMIC3i was designed to express the complete MIC3-ORF (20). The complete MIC3-ORF (open reading frame) was obtained by PCR amplification of *MIC3* from pBluescript II®SK-MIC3 (23), using the primers 5'-GTGTAAGCTTCTTGTCCAACACTGGGTA-3' (forward) and 5'-CACGGATATCTGCGAATGGGCG-3' (reverse), introducing the *Hin*dIII and *Eco*RV restriction sites, respectively. The amplified DNA fragment was inserted into the *Hin*dIII and *Eco*RV sites of the eukaryotic expression vector pcDNA3 (Invitrogen). Plasmid pEGF was designed to express the EGF-like domains of MIC3. The signal sequence and the EGF-like domains of MIC3 were PCR-amplified independently with primers 5'-

GATGAGCTCGCTAGCCTTGTCCAACACTGGTAA-A3’ (forward, ML5)/ 5’GCTCTAGAAGCCTCCGCTGGGGTGCACAT3’ (reverse, ML6) and 5’GCTCTAGAAGCTGTGAAAAGCAGGGCCAT3’ (forward, ML3)/ 5’ATTAAGCTTTCACTGCTTAATTTTCTCACACGTCAC3’ (reverse, ML4), respectively. The two *Xba*I-digested PCR fragments were ligated together. The ligation product was PCR-amplified with primers ML5/ML4. The PCR fragment was inserted into the *Nhe*I and *Hin*dIII sites of pcDNA3.1 (Invitrogen). Plasmid pLectin was designed to express the lectin-like domain of MIC3. The signal sequence and the lectin-like domain of MIC3 were PCR-amplified independently with primers ML5/ML6 and 5’-GCTCTAGATCCCCCAGCAAGCAGGAGA-3’ (forward, ML1)/ 5’-ATTAAGCTTTCAGCAGTCTCCTCCATAGCTTTT3’ (reverse, ML2), respectively. The two *Xba*I-digested PCR fragments were ligated together. The ligation product was PCR-amplified with primers ML5/ML2. The PCR fragment was inserted into the *Nhe*I and *Hin*dIII sites of pcDNA3.1 (Invitrogen). The bicistronic plasmid pIRES-MIC3i-GMCSF was designed to coexpress MIC3i and GM-CSF from the same plasmid. The pIRES plasmid (Clontech) allows the simultaneous expression of two genes by cloning them into two separate multiple cloning sites (MCSA and MCSB) located on either side of the internal ribosome entry site (IRES) from the encephalomyocarditis virus (EMCV). Both MCS’s and the IRES sequence are downstream from the immediate early promoter of cytomegalovirus (CMV). Downstream from the second MCS, SV40 polyadenylation signals direct the correct processing of the 3’ end of mRNA. The GM-CSF sequence was obtained from the pGMCSF plasmid by *BamHI* and *XhoI* digestions and treatment with klenow. The fragment was inserted into the *SmaI* site of the MCSB of pIRES. The MIC3i sequence was generated by PCR from plasmid pMIC3i with primers 5’- CAA GCT GCT AGC CCA ACA CTG GTA AAA ATG CG – 3’ 5’MIC3i-IRES) and 5’- GGA CAG ACG CGT GCT CAC TGC TTA ATT TTC TC – 3’ (3’MIC3i-IRES). PCR products were digested with *NheI* and *MluI* and inserted into the MCSA of pIRES. pIRES utilizes a partially disabled IRES sequence, which reduces the rate of translation initiation at the second downtream cloned gene. To augment the rate of translation initiation at the second position, 43 nucleotides upstream from the *SmaI* site (at position 1745) on the pIRES vector were deleted. This modification generated pIRESopt with a single *SmaI* site in the MCSB. The GM-CSF and MIC3i sequences were inserted into pIRESopt as described above. All constructs were verified by sequencing. The plasmid encoding murine

granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (pGM-CSF) was kindly provided by H. C. J. Ertl (Wistar Institute, Philadelphia, PA).

Assay for *in vitro* GM-CSF expression. GM-CSF expression by monocistronic and bicistronic vectors was tested by transiently transfecting 293 FT cells using a polycationic liposome reagent (LIPOFECTAMINE^{TM}, GIBCO BRL) as instructed by the manufacturer. One day after the transfection, the culture supernatants of transfected 293 FT cells were assayed to determine the expression level of GM-CSF with a commercial GM-CSF enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (BD Biosciences, San Diego, USA)

Plasmid purification. All the plasmids were purified from transformed *E. coli* DH5α by anion-exchange chromatography (EndoFree plasmid Giga or Mega kit, Qiagen GmBH, Hilden, Germany), following the instructions provided by the manufacturer. The purified plasmids were dissolved in sterile endotoxin-free phosphate-buffered saline (PBS; Sigma) and stored at -20°C. The integrity of the DNA plasmids was checked by agarose gel electrophoresis after digestion with the appropriate restriction enzymes. The DNA concentration was determined by absorbance at 260 nm. The OD 260/280 ratios for purified DNA were 1.80-1.95, indicating that preparations were free of any major protein contamination.

DNA immunization. The mice (10 to11 per group) were immunized intramuscularly (i.m.) as previously described (20). Briefly, mice were injected, using syringes with $30^{1}/_{2}$-gauge needles (Microlance, Becton Dickinson), with 100 µl of 10 µM cardiotoxin (Latoxan, Rosans, France); the solutions were injected into each tibialis anterior muscle 5-days before DNA immunization to enhance the uptake of the plasmid DNA (Davis *et* al., 1994). On days 0 and 14, the regenerating muscles of these mice were injected with 50 µg of pMIC3i, pEGF or pLectin combined with 50 µg pGM-CSF, in 100 µl sterile endotoxin-free PBS (50 µl in each muscle) and then boosted on day 28 with 50 µg of plasmid alone. The control group was composed of mice injected i.m. with 50 µg of the empty plasmid, pcDNA3, three times at intervals of 2 weeks.

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Levels of antigen-specific IgG antibodies in serum samples were determined as previously described (20). The TAg at 10 µg/ml was used to coat microtiter plates. The antigen-specific antibody titer is given as the reciprocal of the highest dilution producing an absorbance (OD) that was 2.5-fold greater than that of the serum of mice injected with the empty plasmid, pcDNA3, at the same dilution. Results are expressed as the means of Log_2 titers ± standard deviations (SD).

***In vitro* lymphocyte proliferation studies**. *In vitro* lymphocyte proliferation studies were performed as previously described (20). Splenocytes (3 mice per group) were stimulated with various concentrations of TAg between 0.5 and 15 µg/ml. The incorporated radioactivity (cpm) was measured by liquid scintillation counting. The results are expressed as Δcpm, calculated as the cpm obtained in the presence of the stimulating antigen minus the cpm in the medium alone.

Cytokine assays. Spleen cell proliferation was assayed as previously described (20), the cells were stimulated by incubating with 15 µg/ml of TAg or with the medium alone. Cell-free supernatants were harvested and assayed for interleukin-2 (IL-2) and interleukin-4 (IL-4) activities at 24 h, interleukin-10 (IL-10) activity at 72 h and for gamma-interferon (IFN-γ) activity at 96 h. The concentrations of IL-2, IL-4, IL-10 and IFN-γ were determined by ELISA kit (OptEIA^{TM} Set, Pharmingen, San Diego, USA), following the instructions provided by the manufacturer. The sensitivity limits for the assays were 10 pg/ml for IL-2 and IL-4, 20 pg/ml for IFN-γ and 50 pg/ml for IL-10.

Challenge infection. CBA/J mice were infected orally with 60 cysts of the 76K strain two weeks after the last immunization. One month after the challenge, mice were killed and their brains were removed. Each brain was homogenized in 5 ml of RPMI medium with a pestle and mortar. The mean number of cysts per brain was determined microscopically by counting eight samples (10 µl each) of each homogenate.

Statistical analysis. Levels of significance of the differences between groups of mice were determined by Mann-Whitney U test or two-tailed Student's t test when indicated. Statistical analyses were done with GrahPad Instat 2.01.

RESULTS

Both $CD4^+$ and $CD8^+$ T lymphocytes from mice vaccinated with pMIC3i combined with pGM-CSF are involved in protection. Splenocytes from CBA/J mice vaccinated i.m. with pMIC3i combined with pGM-CSF or empty plasmid pcDNA3 were enriched for $CD4^+$ and $CD8^+$ T lymphocytes. The enriched subpopulations were transferred by i.v. injection to naive mice, followed by oral challenge after 24 h with 60 cysts of the 76K strain. CBA/J mice immunized with 2 x 10^7 $CD4^+$ or $CD8^+$ T lymphocytes from pMIC3 plus pGM-CSF-immunized mice exhibited strong resistance to brain cyst formation one month after oral challenge than those mice receiving $CD4^+$ and $CD8^+$ T lymphocytes from pcDNA3 ($P < 0.002$)-immunized mice (Fig. 1). These results demonstrate that specific $CD4^+$ and $CD8^+$ T lymphocytes provide significant protection against oral *T. gondii* infection (62% and 54% brain cyst reduction, respectively).

MIC3-immune serum did not inhibit infection of cultured cells by *T. gondii* tachyzoites. Replication of anti-MIC3-pretreated tachyzoites in BHK-21 was assayed by [^{3}H]-uracil uptake assays. IgG anti-MIC3 antibodies from mice immunized with pMIC3i combined with pGM-CSF did not inhibit tachyzoite replication (Fig. 2). Thus, anti-MIC3 antibodies may not function protectively *in vivo* to block infection of host cells by tachyzoites.

The EGF-like domains of MIC3 are the major inducers of a humoral response. To determine the levels of antibody titers in immunized mice, all sera were tested by ELISA using TAg (Fig. 3). A high level of specific anti-MIC3 IgG antibody titers was found in all sera of mice immunized with pEGF combined with pGM-CSF, and these titers were increased with the booster. Anti-MIC3 IgG antibodies were detected in 50% of the immunized mice with pLectin combined with pGM-CSF and were detected only after the last booster (third immunization). By contrast, mice injected with the control plasmid pcDNA3 generated no antibodies against MIC3 (Fig. 3).

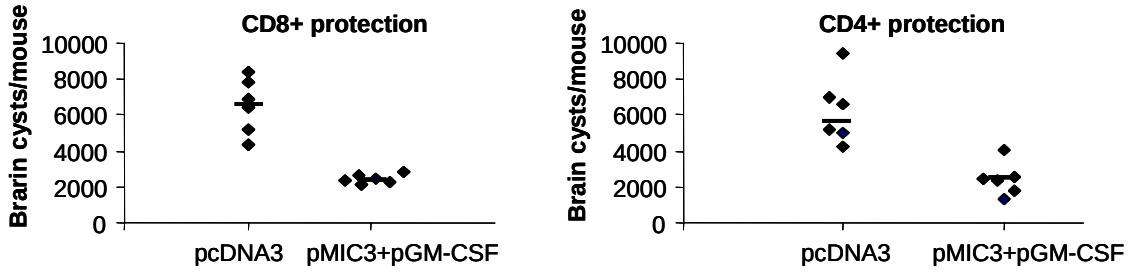


FIG. 1. Adoptive transfer of CD4+ and CD8+ T lymphocytes. CD4+ T and CD8+ lymphocytes were enriched from mice immunized with pMIC3i combined with pGM-CSF or from mice immunized with the empty plasmid pcDNA3 (control) and injected by i.v. injection into four groups of naive mice (n = 6). After 24h, the mice were orally challenged with 60 cysts of *T. gondii* strain 76K. The brain cyst load was determined 1 month after the challenge. The solid bars indicate the median. *P < 0.002* versus control (very significant), Mann Whitney test.

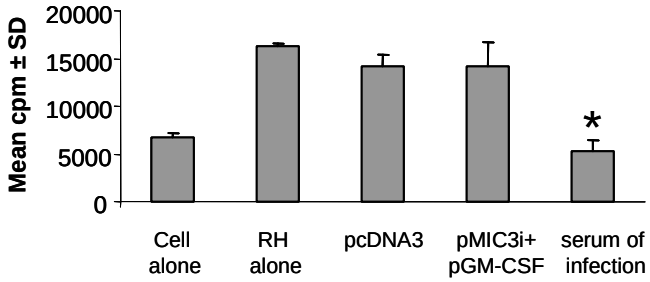


FIG. 2. Effect of anti-MIC3 polyclonal antibodies mouse serum on [3H]-uracil uptake by *T. gondii* within BHK-21 cells. Tachyzoites were incubated for 30 min in cell culture medium with serum from pMIC3i-immunized mice, pcDNA3-immunized mice or serum from an infected mouse at 10% of the final concentration. The mixtures were then added to BHK-21 cells for 2 h, and then pulsed with [3H]-uracil for 16 h. Toxoplasma proliferation was determined by beta counter. Values shown are the mean cpm ± SD of the triplicate samples. The data are representative of two separate experiments performed.
RH alone refers to BHK-21 cells cultured with *T. gondii* incubated only with media.
Cell alone refers to cpm from uninfected BHK-21 cells.
Serum of infection refers to a serum from a *T. gondii*-infected mouse, used as a positive control of inhibition.
*: significant inhibition compared to RH alone (*P< 0.005*, Student's t test)

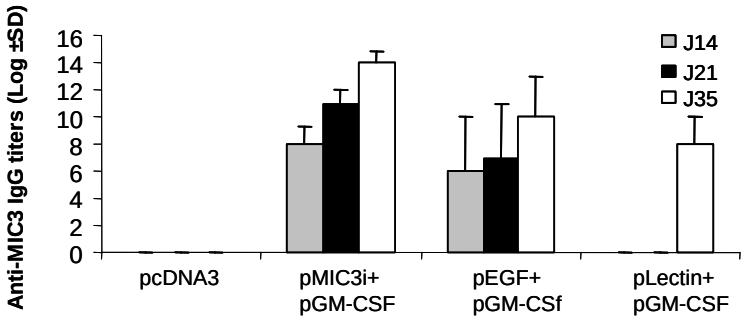


FIG. 3. Determination of specific anti-MIC3 antibody titers in the sera of CBA/J mice immunized with 50 µg pMIC3i, pEGF or pLectine combined with 50 µg GM-CSF-encoding plasmid on day 0 and 14, and then boosted on day 28 with 50 µg of each plasmid. Sera were collected on day 14, 21 and 35 and tested by ELISA using *T. gondii* antigens. The titer is given as the reciprocal of the highest dilution with an absorbance that was 2.5-fold greater than the absorbance of untreated mice sera at the same dilution. Results are expressed as the mean Log_2 titers ± SD and are representative of one of two experiments.

*: Anti-MIC3 antibodies were detected in 50% of mice immunized with pLectin combined with pGM-CSF.

EGF and Lectin domains of MIC3 are inducers of cellular response. Splenocytes from mice immunized with pMIC3i, pEGF or pLectin, combined with pGM-CSF, were prepared 2 weeks after the third immunization to assess the proliferative immune responses to MIC3 (Fig. 4). Marked highly specific lymphoproliferation was observed in splenocyte cultures from mice immunized with pMIC3i combined with pGM-CSF if stimulated with TAg (Δcpm, 8000 at 15 µg/ml of TAg). A slight but specific dose-dependent lymphoproliferation was observed in splenocyte cultures from mice immunized with pEGF or pLectin combined with pGM-CSF if stimulated with TAg (Δcpm, 3000 at 15 µg/ml of TAg). By contrast, splenocytes from mice immunized with the control plasmid pcDNA3 did not proliferate if stimulated with TAg. Thus, both EGF and Lectin domains of MIC3 contain T epitopes.

The supernatants of splenocytes cultured from mice immunized with pMIC3i, pEGF or pLectin, combined with pGM-CSF, were harvested at various times after the restimulation with TAg, and were assessed for the production of IL-2, IFN-γ, IL-4 and IL-10 (Fig. 4). Specific amounts of IL-2 were synthesized by the restimulated splenocytes from the mice immunized with pMIC3i, pEGF or pLectin combined with pGM-CSF. Significantly large amounts of IFN-γ were produced in the supernatants of restimulated splenocyte cultures from mice immunized with pMIC3i (59.6 ng/ml ± 0.015) combined with pGM-CSF. Specific amounts of IFN-γ were also produced in the supernatants of restimulated splenocyte cultures from mice immunized with pEGF (18.87 ng/ml ± 7.74) or pLectin (9.5 ng/ml ± 2.46) combined with pGM-CSF, but to a less degree than that produced by splenocytes from pMIC3i-immunized mice. By contrast, no specific release of IL-4 and IL-10 from any culture supernatant was demonstrated (data not shown). These results indicate that a Th1 immune response was induced by immunization with MIC3 DNA and both EGF and Lectin domains of MIC3 are inducers of this response.

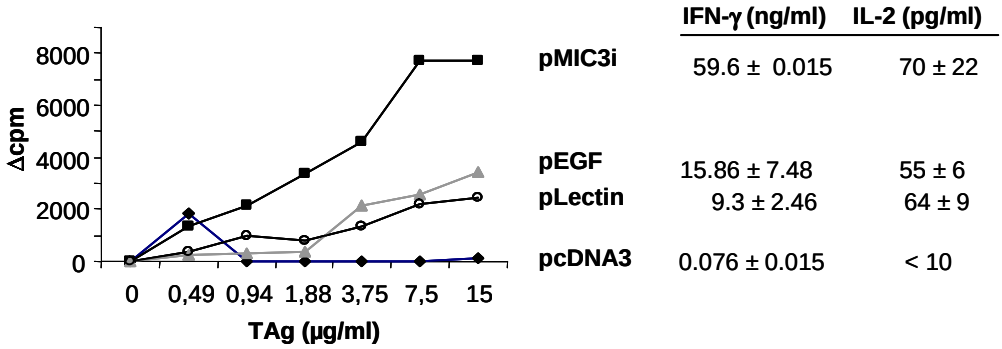


FIG. 4. *In vitro* proliferation and cytokine production of splenocytes from CBA/J mice (3 mice per group) immunized with 50 µg pMIC3i, pEGF or pLectin combined with 50 µg GM-CSF-encoding plasmid on day 0 and 14, and then boosted on day 28 with 50 µg of every plasmid, in response to *T. gondii* antigen. Control splenocytes were isolated from mice receiving the empty plasmid, pcDNA3. The results of proliferation are expressed as Δcpm, calculated by subtracting the mean counts per min of unstimulated cells from the mean counts per min of stimulated cells. Cell-free supernatants from stimulated splenocytes (TAg, 15 µg/ml) were harvested and assayed for IL-2 at 24h and for IFN-γ activity at 96h. Results of cytokines are representative of one of two experiments.

Both EGF and Lectin domains of MIC3 are involved in protection. To test whether vaccination with plasmid DNA encoding EGF or Lectin domains of MIC3 induced effective protection against *T. gondii* infection, the immunized mice were orally challenged 2 weeks after the last immunization with 60 cysts of *T. gondii* 76K strain. One month after the oral challenge, the cysts in the brains of the mice were counted (Fig. 5). Effective and highly significant protection was displayed in mice immunized with pEGF, pLectin or pMIC3i, combined with pGM-CSF (P<0.001 versus mice immunized with pcDNA3): these mice had, respectively, 56%, 60% and 70% fewer brain cysts than mice immunized with pcDNA3 (negative control) (Fig. 5). Thus, both EGF and Lectin domains of MIC3 are involved in protection against *T. gondii* infection.

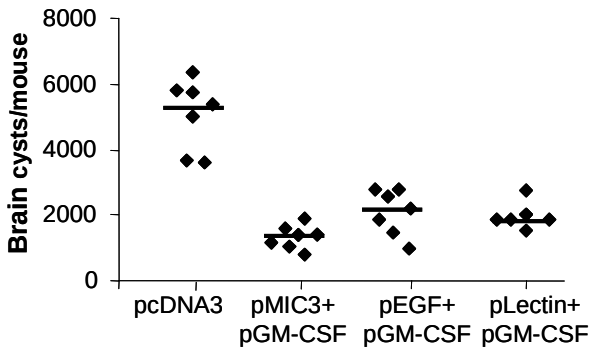


FIG. 5. Protection of CBA/J mice against *T. gondii* oral infection. The mice were immunized with 50 μg pMIC3i, pEGF or pLectin combined with 50 μg GM-CSF-encoding plasmid on day 0

and 14, and then boosted on day 28 with 50 μg of each plasmid. The vaccinated mice (n = 7) were orally challenged 2 weeks after the last immunization with 60 cysts of *T. gondii* strain 76 K. The brain cyst load was determined 1 month after challenge. Mice inoculated with empty plasmid pcDNA3 were used as control. The solid bars indicate the median. Data shown are representative of one of two individual experiments. $P < 0.001$ with respect to control (Mann Whitney test)

The codelivery of GM-CSF by a bicistronic plasmid provides the most effective procedure for enhancing the adjuvant properties of GM-CSF.

To further improve the effects of GM-CSF, we adopted a strategy based on a bicistronic vector**.** Bicistronic plasmids use an internal ribosome entry site (IRES) placed between two coding regions. This allows the ribosome to attach to mRNA and translate the downstream coding sequence, while the upstream sequence is translated by cap-dependent mechanisms (30). While cap-dependent translation initiation from bicistroinic mRNAs remains similar to monocistronic expression, internal initiation mediated by viral IRESs is often lower (19). For this reason, we chose to insert the GM-CSF gene in the second cistron of pIRES. Furthermore, EMCV IRES sequence insertion into pIRES mutated AUG 11. Initiation in type II IRES usually occurs at the AUG 11 codon. The initiation codon AUG 11 is located downstream from a sequence of about 20 nucleotides (a spacer designed Xm), preceded by a poly-pyrimidine tract (Yn tract; n=5-7 nucleotides). The length of the Yn tract and the Xm spacer is important for IRES function. In pIRES, the AUG that is used for secondary translation is contained in the sequence of the inserted gene. The distance between the Yn tract and the AUG is as such increased and, therefore, a less efficient translation of the downstream gene is observed (Clontech). Indeed, the amount of GM-CSF produced in the culture supernatant of cells transfected with pIRES-MIC3i-GMCSF (Xm=43) was 26-fold lower than that produced by monocistronic expression (12.6 ng/ml vs 327 ng/ml). To increase the translational efficacy, the length of Xm was reduced (Xm =22 nucleotides). As expected, the amount of GM-CSF produced in the culture supernatant of cells transfected with pIRESopt-MIC3i-GMCS was higher than that transfected with pIRES-MIC3i-GMCSF; however, this was still lower (about 8-fold lower, 42.1ng/ml vs 327ng/ml) than monocistronic expression. The entire coding sequence of MIC3 was inserted into the first cistron, as various domains of MIC3 are involved in protection against *T. gondii***.** The ability of mammalian cells to secrete MIC3i after transfection with either pIRESopt-MIC3i-GMCS or the monocistronic vector pcDNA3-MIC3i was tested by western blotting after probing with anti-MIC3i mice sera. MIC3i expression levels in cells transfected with pIRESopt-MIC3i-GMCS and in cells with the monocistronic vector were similar (data not shown).

The efficacy of the bicistronic DNA vaccine was compared with that of the monocistronic pMIC3i vector mixed with pGMCSF (Table 1). Groups of CBA/J mice were immunized with 10 µg of pIRESopt-MIC3i-GMCSF three times at 2 week intervals or with pMIC3i (10 µg) mixed with pGMCSF (10 µg) as previously described (see

materials and methods). Control mice were left untreated. After the challenge, there were no significant differences in the reduction of brain cysts between mice vaccinated with 10 µg of pMIC3i combined with pGMCSF and control mice. However, mice vaccinated with 10 µg of pIRESopt-MIC3i-GMCSF had 56% fewer brain cysts than the control mice (P<0.0001).

Compared with controls, spleen cells from pIRES-vaccinated mice produced particular levels of IFN-γ if stimulated with TAg (3.12 ± 0.83 ng/ml vs 0.71 ± 0.4 ng/ml). This was not the case in spleen cells from pcDNA3-vaccinated mice (2.44 ± 1.2 ng/ml vs 0.71 ± 0.4 ng/ml). Specific anti-MIC3 IgG antibody titers were found in the sera of all pcDNA3-vaccinated mice, whereas only 3 of 11 mice vaccinated with pIRES generated antibodies against MIC3.

TABLE I. The protective efficacy of MIC3 was improved by the use of a bicistronic vector.

Group	Brain cysts number[a] (n=8)	IgG titers[a] Log2 (n=11)	Cytokine production[a] IFN-γ ng/ml (n=3)
Untreated	4077 ± 1860	-	0.71 ± 0.4
pIRESopt-MIC3i-GMCSF	1796 ± 528[b]	10 ± 0.0[c]	3.12 ± 0.83[d]
pMIC3i+pGM-CSF	3480 ± 803	9 ± 1.5	2.44 ± 1.2

a Values are means ± standard deviations
b P<0.0001 (t test), extremely significant compared to untreated mice
c anti-MIC3 antibodies were detected in 3 mice
d P=0.010 (t test), significant compared to untreated mice

DISCUSSION

We have previously demonstrated that a DNA vaccine encoding the novel target antigen, MIC3 protein, of *T. gondii* is a simple and potent vaccine that elicits strong specific cellular and humoral immune responses, as well as providing an effective, significant protection against *T. gondii* chronic infection in CBA/J mice. Also, a combination of a plasmid encoding GM-CSF enhanced the immune response and the protection provided (20).

Here, we first investigated the contribution of the cellular and humoral anti-MIC3 immune responses to protection. DNA vaccination is a technique with strong potential to elicit cell-mediated immunity, triggering antigen-specific production of IFN-γ and priming CTL responses (17). IFN-γ, (25, 38, 89), $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells are the main players involved in resistance to *T. gondii*, during both acute and chronic phases of infection (1, 14, 36). In agreement with those findings, our results showed that both $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells from pMIC3i-immunized mice are involved in protection against the chronic phase of infection.

The relative contributions of $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells primed by DNA vaccines against *T. gondii* infection were also investigated by Nielsen *et* al. (29) and Scorza *et* al. (32) by adoptive transfer or *in vivo* depletion. In adoptive transfer experiments, naive mice that received $CD8^+$ T cells from SAG1 DNA-vaccinated mice had extended survival times after challenge with RH strain (29). *In vivo* depletion of $CD8^+$ T cells eliminated the protective effect of the GRA1 DNA vaccine against acute toxoplasmosis, whereas depletion of $CD4^+$ T cells had no influence on mortality (32). However, *in vivo* $CD4^+$ T cell depletion led to an increase in brain cyst burden during the chronic phase of infection. These previous experiments and our findings here provide no conclusive information on the DNA vaccine-elicited effector mechanism; this mechanism may depend on direct $CD8^+$ T cell cytolysis or secreted IFN-γ.

Indeed, both CD8 cytolytic activity and IFN-γ secretion can confer protection as shown in the ts4 *T. gondii* vaccination model (14, 18). Perforin-deficient mice vaccinated with ts4 resist infection by the highly virulent RH strain, suggesting that control of acute infection does not require CTL activity. However, CTL function appears to play a role in host protection during the later stages of infections, with perforin-deficient mice being slightly more susceptible than wild type animals during chronic ME49 infection (11). In addition, B2-microglobulin-deficient mice, lacking functional $CD8^+$ T cells (major

histocompatibility complex class I molecules are not expressed), could survive acute *T. gondii* infection; however, they become more susceptible to the chronic phase of infection (12). CTL function is possibly involved in the prevention of cyst reactivation or, alternatively, may limit the number of parasites initially encysting within tissues of the CNS. However, Yamashita *et* al. (43) demonstrate that tachyzoites within a cell targeted for cell lysis are not killed by the cytolytic event. CTL activity may spread infection by release of tachyzoites. Alternatively, tachyzoites released by CTL lysis may then be susceptible to phagocytosis and inactivation by cells as suggested by Denkers (10).

$CD4^+$ T cells are important for early IFN-γ production during *T. gondii* infection and an absence of $CD4^+$ leads to parasite multiplication in the tissues (4). CD4-deficient mice did exhibit increased parasite burdens in the brain (4). $CD4^+$ T cells, through production of IL-2, are important for the induction of $CD8^+$ T cell response in *T. gondii*-infected hosts, as well as for the maintenance of $CD8^+$ T cell effector immunity (4). $CD4^+$ T cells also contributed significantly to protection against chronic infection via their role as helper cells for production of isotype-switched antibodies (21).

To elucidate whether B cells or antibodies play a protective role in resistance against infection with *T. gondii,* B cell-deficient mice (µMT) have been used. These mice have normal Ag-presenting function for priming $CD4^+$ T cells, as well as unimpaired $CD8^+$ T cell response. *T. gondii*-infected µMT mice survived the acute phase of the infection but died 3-4 weeks after infection. In these mice, mortality was associated with continuous proliferation of tachyzoites in their brains and lungs. Expression of IFN-γ, TNF-α and inducible NO synthase did not differ between infected µMT mice and controls (22). Adoptive transfer of anti-*T. gondii* IgG Abs to infected µMT mice prevented the early mortality and pathology associated with tachyzoites in the brain (Kang *et* al., 2000). In addition, Sayles *et* al. (31) have shown that resistance to a challenge infection with virulent RH tachyzoites can be markedly improved in ts4-immunized µMT mice by administration of serum from donors immunized with *T. gondii*. Antibodies may function protectively *in vivo* by blocking infection of host cells by tachyzoites rather than functioning as part of FC receptor-dependent or complement-dependent anti-toxoplasma effector mechanism (31).

It was shown from studies cited above that antibodies may play a role against *T. gondii* infection. Thus, we evaluated *in vitro* the effect of anti-MIC3 immune sera on the infection of cells by the RH strain of *T. gondii*. Pretreatment of tachyzoites with anti-MIC3 immune sera did not prevent tachyzoite replication in BHK-21 cells, suggesting

that anti-MIC3 Ab do not inhibit *T. gondii* cell invasion. Micronemes are apical secretory organelles, presumed to play a predominant role in the early phase of the invasion process by discharging adhesins capable of interacting with host cell receptors (27, 35). MIC3 is one of these adhesins. MIC3 binds to both the surface of the host cells and the surface of the parasites (13). The receptor binding site of MIC3 is located in the N-terminal chitin binding-like domain. The N-terminal pro-peptide cleavage and C-terminal dimer formation are needed to allow the expression of the binding property (5). pMIC3i expressed a dimeric recombinant MIC3 that is antigenic and immunogenic (20). However, the protein contained the pro-peptide, which is not cleaved by mammalian cells and does not bind to the cell surface (5). Thus, with the recombinant MIC3, the receptor binding site is poorly accessible and/or is not "in a good conformation". Garcia-Reguet *et* al. (13) have previously shown that rabbit polyclonal antibodies against immunoaffinity-purified MIC3 and mouse infection sera interfere with cell binding to MIC3. However, these antibodies did not interfere with invasion (13). In addition, the anti-MIC3 4. 2F3 monoclonal antibody, of which the binding site is located within EGF domain of MIC3, has no effect on invasion (16). Together, previous results and those reported here suggest that either the antibody is unable to reach the target in the organisms, or it does not have the necessary affinity and/or specificity. Whether *T. gondii* infection, immunoaffinity-purified MIC3 or pMIC3i immunization induced antibodies directed against the receptor binding site remains to be elucidated. It is also possible that alternative pathways can substitute MIC3 in invasion. Indeed, deletion of *MIC3* generated mutants that were still able to invade cells (6). However, immunization of B cell-deficient mice with pMIC3i combined with pGM-CSF mice could definitively demonstrate whether B cells may or may not be required for resistance to *T. gondii*.

Our studies suggested that the mechanism of protection induced by pMIC3i is closely related to $CD4^+$ and $CD8^+$ T lymphocytes. Therefore, it was of interest, to know the MIC3 domains likely to express major T epitopes involved in protection. We constructed a plasmid encoding the EGF-like domains, pEGF, and a plasmid encoding the lectin-like domain, pLectin, of MIC3. The CBA/J mice were immunized i.m. with pEGF or pLectin, combined with pGM-CSF as previously described (20).

All mice immunized intramuscularly with pEGF combined with pGM-CSF and 50% of mice immunized with pLectin combined with pGM-CSF developed a specific anti-MIC3 humoral response as determined by ELISA using TAg, which contained the mature form of MIC3. These findings suggested that B epitopes are located within the EGF domains.

Alternatively, mice immunized with pLectin did not develop a strong humoral response because this construct is weakly expressed in mice. Indeed, the construct used in this study is similar to the construct used by Cérède *et* al. (5). These authors previously showed that the lectin-like domain was expressed as a monomer and that it was always weakly expressed.

A slightly specific lymphoproliferation was observed in splenocyte cultures from mice immunized with pEGF or pLectin combined with pGM-CSF when stimulated with TAg. This cellular immune response was associated with IFN-γ and IL-2 synthesis. By contrast, no specific release of IL-4 and IL-10 from any culture supernatant was shown. These findings indicated that a Th1 immune response was induced and that both EGF and Lectin domains of MIC3 are inducers of this response.

To test whether vaccination with plasmid DNA encoding EGF or Lectin domains of MIC3 contributed to the protection against *T.gondii* infection, the immunized mice were orally challenged 2 weeks after the last immunization with 60 cysts of *T. gondii* 76K strain. Effective and highly significant protection was obtained in the mice immunized with pEGF, pLectin or pMIC3i, combined with pGM-CSF: these mice, respectively, had 56%, 60% and 70% fewer brain cysts than mice immunized with pcDNA3 (negative control) respectively. Thus, both EGF and Lectin domains of MIC3 are involved in protection against *T. gondii* infection, suggesting that both domains contain major T epitopes involved in protection. Further studies are needed to define protective T cell epitopes within both EGF-like and lectin-like domains of MIC3. Potential T cell epitopes could be predicted by computer algorithms.

To further enhance the protective efficacy of *MIC3*, the entire coding sequence of MIC3 together with the coding sequence of GM-CSF was introduced into the bicistronic vector, pIRES. To optimize the expression of GM-CSF, the pIRES vector was modified (pIRESopt). However, the expression of GM-CSF was still below that of the monocistronic vector. Mice immunized with 10 µg of pIRESopt-MIC3-GMCSF had fewer cysts than control mice. Also, splenocytes from these mice produced more IFN-□ than mice immunized with 10 µg of pMIC3i plus pGMCSF, not protected against brain cyst formation. These results are consistent with previous data showing that the effect of GM-CSF was increased by a bicistronic DNA vaccine strategy (2, 8, 24). The use of one vector instead of two, at least at low doses, is important for optimal protection against *T. gondii*, within the context of cocktail DNA vaccines against *T. gondii*.

In conclusion, we report interesting immunological data relating to the mechanism of protection provided by the vaccine candidate, *MIC3* of *T. gondii*, against toxoplasmosis. We demonstrated that the protection induced by pMIC3i was mainly mediated by cellular immunity. $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells contributed to resistance against the chronic stage of infection by *T. gondii*. Furthermore, both EGF and Lectin domains of MIC3 are involved in the protection. A bicistronic vector designated to express both MIC3i and GM-CSF improved the protective efficacy of the MIC3 gene.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from the Conseil Général d'Indre et Loire and from the Région Centre.

We appreciate the gift of GM-CSF plasmid provided by H. C. J. Ertl. We thank, J. Pierre, J. M. Rith and T. Papin for technical assistance. We also thank S. Bigot for secretarial assistance.

REFERENCES

1. **Araujo, F. G.** 1991. Depletion of L3T4^{+} (CD4^{+}) lymphocytes-T prevents development of resistance to *Toxoplasma. gondii* in mice. Infect. Immun. **59**:1614-1619.

2. **Barouch, D. H., Santra S., Tenner-Racz K., Racz P., Kuroda M. J., Schmitz J. E., Jackons S. S., Lifton M. A., Freed D. C., Perry H. C., Davies M-E., Shiver J. W., and N. L. Letvin**. 2002. Potent CD4+ T cell responses elicited by a bicistronic HIV-1 DNA vaccine expressing gp 120 and GM-CSF. J. Immunol. **168**:562-8.

3. **Buxton, D.** 1998. Protozoan infections (*Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Sarcocystis spp*.) in sheep and goats: recent advances. Vet. Res. **29**:289-310.

4. **Casciotti, L., K. H. Ely, M. E. Williams, and I. A. Khan.** 2002. CD8^{+}-T-Cell immunity against *Toxoplasma gondii* can be induced but not maintained in mice lacking conventional CD4^{+} T cells. Infect. Immun. **70**:434-443.

5. **Cérède, O., J. F. Dubremetz, D. Bout, and M. Lebrun.** 2002. The *Toxoplasma gondii* protein MIC3 requires pro-peptide cleavage and dimerization to function as adhesin. EMBO. J .**21**:2526-2536.

6. **Cérède, O., J. F. Dubremetz, M. Soête, D. Deslée, H. Vial, D. Bout, and M. Lebrun**. 2005. Synergistic role of micronemal proteins in *Toxoplasma gondii* virulence. J. Exp. Med. **201**:453-463.

7. **Chardès, T., I. Bourguin, M.-N. Mévélec, J. F. Dubremetz, and D. Bout.** 1990. Antibody responses to *Toxoplasma gondii* in sera, intestinal secretions and milk from orally infected mice and characterization of target antigens. Infect. Immun. **58**:1240-1246.

8. **Cho, J. H., Lee S. W., and Y. C. Sung**. 1999. Enhanced cellular immunity to hepatitis C virus nonstructural proteins by codelivery of granulocyte macrophage-colony stimulating factor gene in intramuscular DNA immunization. Vaccine **17**:1136-44.

9. **Davis, H. L., M.-L. Michel, M. Mancini, M. Schleef, and R. G. Whalen.** 1994. Direct gene transfer in skeletal muscle: plasmid DNA based immunization against the hepatitis B virus surface antigen. Vaccine. **12**:1503-1509.

10. **Denkers E. Y.** 1999. T lymphocyte-dependent effector mechanisms of immunity to *Toxoplasma gondii*. Microbes Infect. 699-708.

11. **Denkers E. Y., G. Yap, T. SchartonKersten, H. Charest, B. A. Butcher, P. Caspar, S. Heiny, and A. Sher.** 1997. Perforin-mediated cytolysis plays a limited role in host resistance to *Toxoplasma gondii*. J. Immunol. **159**:1903-1908.

12. **Denkers, E. Y., and R. T. Gazzinelli.** 1998. Regulation and function of T-cell-mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection. Clin. Microbiol. Rev. **11**:569-588.

13. **Garcia-Réguet, N., M. Lebrun, M. N. Fourmaux, O. Mercereau-Puijalon, T. Mann, C. J. Beckers, B. Samyn, J. Van Beeumen, D. Bout, and J. F. Dubremetz.** 2000. The microneme protein MIC3 of *Toxoplasma gondii* is a secretory adhesin that binds to both the surface of the host cells and the surface of the parasite. Cell Microbiol. **2**:353-364.

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

15. **Gazzinelli, R., Y. Xu, S. Hieny, A. Cheever, and A. Sher.** 1992. Simultaneous depletion of $CD4^+$ and $CD8^+$ T lymphocytes is required to reactivate chronic infection with *Toxoplasma gondii*. J. Immunol. **149**:175-180.

16. **Grimwood, J., J. E. Smith.** 1996. *Toxoplasma gondii*: the role of parasite surface and secreted proteins in host cell invasion. Int. J. Parasitol. **26**:169-173.

17. **Gurunathan, S., C. Y. Wu, B. L. Freidag, and R. A. Seder.** 2000. DNA vaccines: a key for inducing long-term cellular immunity. Curr. Opin. Immunol. **12**:442-447.

18. **Hakim, F. T., R. T. Gazzinelli, E. Denkers, S. Hieny, G. M. Shearer, A. Sher.** 1991. $CD8^+$ T cells from mice vaccinated against *Toxoplasma gondii* are cytotoxic for parasite-infected or antigen-pulsed host cells. J. Immunol. **147**:2310-6.

19. **Hennecke M**., **Kwissa M, Metzger K, Oumard A, Kroger A, Schirmbeck R, Reimann J, Hauser H.** 2001. Composition and arrangement of genes define the strength of IRES-driven translation in bicistronic mRNAs. Nucleic Acids Research **29**:3327-3334.

20. **Ismael, A. B., D. Sekkai, C. Collin, D. Bout, and M-N. Mévélec.** 2003. The *MIC3* gene of *Toxoplasma gondii* is a novel potent vaccine candidate against toxoplasmosis. Infect. Immun. **71**:6222-6228.

21. **Johnson, L. L., and P. C. Sayles.** 2002. Deficient humoral responses underlie susceptibility to *Toxoplasma gondii* in CD-4 deficient mice. Infect. Immun. **70**:185-191.

22. **Kang, H., J. S. Remington, Y. Suzuki.** 2000. Decreased resistance of B cell-deficient mice to infection with *Toxoplasma gondii* despite unimpaired expression of IFN-γ, TNF-α, and inducible Nitric Oxide synthase. J. Immunol. **164:**2629-2634.

23. **Khan I. A., Ely, K. H., Kasper, L. H.** 1994. Antigen-Specific CD8(+) T Cell Clone Protects Against Acute *Toxoplasma Gondii* Infection in Mice. J. Immunol. **152**:1856-1860.

24. **Lee S. W.**, **Cho J. H., Sung YC**. 1998. Optimal induction of heptitis C virus envelope-specific immunity by bicistronic plasmid DNA inoculation with the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene. J. Virol. **72**:8430.

25. **McCabe, R. E., B. J. Luft, J. S. Remington.** 1984. Effect of murine interferon gamma on murine toxoplasmosis. J. Infect. Dis. **150**:961-2.

26. **McLeod, R., D. Mack.** 1986 Secretory IgA Specific for T*oxoplasma gondii*. J. Immunol. **136**:2640-3.

27. **Menard, R.** 2001. Gliding motility and cell invasion by Apicomplexa: insights from the Plasmodium sporozoite. Cell Microbiol. **3**:63-73.

28. **Montoya, J. D., and O. Liesenfeld.** 2004. Toxoplasmosis. The LANCET. **363**:1965-1976.

29. **Nielsen, H. V., S. L. Lauemøller, L. Christiansen, S. Buus, A. Fomsgaard, and E. Petersen.** 1999. Complete protection against lethal *Toxoplasma gondii* infection in mice immunized with a plasmid encoding the *SAG1* gene. Infect. Immun. **67**:6358-6363.

30. **Rainczuk A., T. Scorza, T. W.Spithill, and P. M. Smooker.** 2004. A Bicistronic DNA vaccine containing apical membrane antigen 1 and merozoite surface protein 4/5 can prime humoral and cellular immune responses and partially protect mice against virulent *Plasmodium chabaudi* adami DS Malaria. Infect. Immun. **72:**5565-5573.

31. **Sayles P. C., G. W. Gibson, L. L. Johnson.** 2000. B cells are essential for vaccination-induced resistance to virulent *Toxoplasma gondii*. Infect. Immun. **68**: 1026-33.

32. **Scorza, T., S. D'Souza, M. Laloup, J. Dewit, J. De Braekeleer, H. Verschueren, M. Vercammen, K. Huygen, and E. Jongert**. 2003. A GRA1 DNA vaccine primes cytolytic $CD8^+$ T cells to control acute *Toxoplasma gondii* infection. Infect. Immun. **71**:309-316.

33. **Sharma, S. D., J. Mullenack, F. G. Araujo, H. A. Erlich, and J. S. Remington.** 1983. Western blot analysis of the antigens of *Toxoplasma gondii* recognized by human IgM and IgG antibodies. J. Immunol. **131**:977-983.

34. **Shirahata, T., T. Yamashita, C. Ohta, H. Goto, and A. Nakane.** 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. Microbiol. Immunol. **38**:789-796.

35. **Soldati, D., J. F. Dubremetz, and M. Lebrun.** 2001. Microneme proteins: structural and functional requirements to promote adhesion and invasion by the apicomplexan parasite Toxoplasma gondii. Int. J. Parasitol. **31**:1293-1302.

36. **Suzuki, Y., and J. S. Remington.** 1988**.** Dual regulation of resistance against *Toxoplasma gondii* infection by Lyt-2^+ and Lyt-1+, L3T4^+ T cells in mice. J. Immunol. **140**:3943.

37. **Suzuki, Y., F. K. Conley, and J. S. Remington.** 1989. Importance of endogenous IFN-γ for prevention of toxoplasmic encephalitis in mice. J. Immunol. 143:2045.

38. **Suzuki, Y., M. A. Orellana, R. D. Schreiber, and J. S. Remington.** 1989. Interferon-γ: the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. Science**.** **240**:512.

39. **Svanholm, C., Lowenadler B., and H. Wigzell .** 1997. Amplification of T-Cell and Antibody Responses in DNA-Based Immunization with HIV-1 Nef by Co-Injection with a GM-CSF Expression Vector. Scand. J. Immunol. **46**:298-303.

40. **Tenter, A. M., A. R. Heckeroth, and L. M. Weiss.** 2000. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. Int. J. Parasitol. **30**:1217-1258.

41. **Velge-Roussel, F., I. Dimier-Poisson, D. Buzoni-Gatel, D. Bout.** 2001. Anti-SAG1 peptide antibodies inhibit the penetration of *Toxoplasma gondii* tachyzoites into enterocyte cell lines. Parasitology **123**:225-233.

42. **Xiang, Z. Q., and H. C. Ertl.** 1995. Manipulation of the immune response to a plasmid-encoded viral antigen by coinoculation with plasmids expressing cytokines. Immunity **2:**129-135.

43. **Yamashita K., K. Yui, M. Ueda and A. Yano.** 1998. Cytotoxic T-lymphocyte-mediated lysis of *Toxoplasma gondii*-infected target cells does not lead to death of intracellular parasites. Infect. Immun. **66**:4651-4655.

Article 2

Evaluation de la protection du vaccin ADN avec le gène de la profiline de *T. gondii* contre la toxoplasmose chronique en modèle murin.

Introduction

La profiline de *T. gondii* a la capacité d'induire la synthèse d'IL-12 par les cellules dendritiques conventionelles CD8α+ et les cellules dendritiques plasmacytoïdes (Yarovinski et al, 2005 ; Pepper, Dzierszinski, et al ;, 2008). Cette sécrétion nécessite une liaison via le TLR11 et passe par la voie de transcription MyD88. Parallèlement et du fait même de sa capacité à stimuler le système immunitaire inné, Yarovinski et *al* ont montré que suite à une immunisation avec un extrait parasitaire ou après infection avec des tachyzoïtes, la profiline de *T. gondii* induit des lymphocytes T spécifiques produisant de l'IFN-γ chez la souris. La profiline de *T. gondii* a été définie par ces auteurs comme une protéine immunodominante dont l'immunogénicité est dépendante du TLR11. De par ses propriétés, la profiline peut être considérée comme un candidat vaccin potentiel.

L'étude de la profiline de *T. gondii* en tant qu'immunogène a été réalisée dans le cadre de la vaccination ADN chez les souris CBA/J. Parallèlement, du fait du fort pourcentage d'homologie entre les profilines de *T.gondii* et de *Neospora caninum* (96%), le potentiel vaccinant de la profiline de *N. caninum* a été évalué contre la toxoplasmose.

Les séquences codant pour les profilines de *T. gondii* et de *N. caninum* ont été amplifiées et clonées dans le vecteur pPROMTEST en phase avec la séquence signal de l'IL-2 ce qui permet d'obtenir l'expression d'une forme sécrétée des profilines (InVivoGene). La profiline est une protéine cytoplasmique, il a été montré que la nature des réponses immunes pouvaient être différente en fonction de la localisation de l'antigène exprimé (cytoplasmique ou sécrété), c'est pourquoi deux constructions ont été envisagées (Boyle, Koniaras et al. 1997). La séquence de la profiline de *T. gondii*, avec et sans séquence signal a été clonée dans le vecteur bicistronique pIRESopt-GMCSF, pour obtenir respectivement les plasmides pTgPRF-sec et pTgPRF-cyt. La séquence de la profiline de *N. caninum* a été clonée dans le vecteur bicistronique pIRESopt-GMCSF avec la séquence signal (pNcPRF-sec). Parallèlement, la séquence de la profiline de *T. gondii* a été clonée avec un tag His et un tag V5 dans un plasmide permettant son expression en cellules d'insecte. Ce dernier clonage permet d'obtenir de la protéine purifiée (protéine

recombinante S2-profiline) pour les expériences de stimulation *in vitro* et les dosages ELISA.

L'analyse des protéines exprimées par les cellules COS après transfection avec les différents plasmides, montre que les formes sécrétées subissent des modifications post-traductionnelles, notamment une N-glycosylation et des ponts disulfures sont impliqués dans la formation de multimères. La protéine recombinante S2-profiline subit les mêmes modifications. Les profilines de *T.gondii* contenues dans les cellules COS transfectées par les plasmides pTgPRF-cyt et pTgPRF-sec induisent *in vivo* de l'IL-12 alors que la protéine S2-profiline n'induit de l'IL-12 qu'après réduction des ponts disulfures. Ces résultats indiquent que la glycosylation n'a pas d'effet sur la liaison de la protéine au TLR-11, contrairement à la modification de la conformation des protéines par les ponts disulfures. Les cellules transfectées avec le plasmide pTgPRF-sec, induisent de l'IL-12 car elles contiennent à la fois des protéines modifiées et non modifiées.

Les plasmide exprimant les formes sécrétées des profilines de *T. gondii* et de *N. caninum* confèrent une protection significative contre la toxoplasmose chronique (réduction du nombre de kystes cérébraux de 40%) après épreuve orale avec des kystes de la souche 76K (type II) alors que le plasmide exprimant la forme cytoplasmique de la profiline de *T. gondii* ne confère pas de protection. Du fait de sa forte homologie de séquence avec la profiline de *T. gondii*, la profiline de *N. caninum* confère une protection comparable à la profiline de *T. gondii*.

L'immunisation des souris CBA/J, par voie intramusculaire, avec les plasmides pTgPRF-cyt, pTgPRF-sec ou pNcPRF-sec induit la production d'IgG spécifiques anti-profiline de *T. gondii* sans différence significative entre les plasmides. Généralement, les protéines sécrétées induisent plus d'anticorps que les formes cytoplasmiques correspondantes (Boyle, Koniaras et al. 1997). Bien que les immunoempreintes utilisées pour mettre en évidence l'expression des protéines dans les cellules transfectées ne permettent pas de quantifier l'expression de ces dernières, une expression moindre des formes sécrétées, par rapport à la forme cytoplasmique a été observée. De plus, la présence des formes sécrétées dans les surnageants de culture a été difficile à mettre en évidence. Il est donc possible que *in vivo* les formes sécrétées soient moins bien exprimées que la forme cytoplasmique, ce qui pourrait expliquer les résultats obtenus pour la réponse humorale.

Une réponse cellulaire de type 1 caractérisée par la production d'Il-2 et d'IFN-γ (pas l'IL-4, ni d'IL-10) après stimulation des splénocytes avec la protéine S2-profiline a été observée quelque soit le plasmide vaccinant. Cependant, les splénocytes de certaines

souris immunisées avec pTgPRF-cyt ne répondent pas à la stimulation par la protéine S2-profiline suggérant une stimulation moindre de la réponse cellulaire avec la forme cytoplasmique ce qui pourrait expliquer l'absence de protection avec cette dernière. Comme attendu, les souris immunisées avec la profiline de *N. caninum* se comportent comme les souris immunisées avec pTgPRF-sec, les anticorps anti-profiline de *N. caninum* reconnaissent la profiline de *T. gondii*, de même la réponse cellulaire induite par la profiline de *N. caninum* est stimulée *in* vitro par la profiline de *T. gondii.*

Les profilines, en particulier la forme cytoplasmique, stimulent la production d'IgG1 et d'IgG2a anti-profiline, avec une prédominance des IgG2a. Prédominance qui n'est cependant pas très marquée quelque soit le plasmide vaccinant et sans différence significative entre les plasmides. De par la stimulation via le TLR11 et l'induction de lymphocytes T CD4+ producteurs d'IFN-γ (Yarovinsky et *al* 2005, Yarovinsky et *al* 2006). Une réponse humorale avec une forte dominance des IgG2a aurait pu être attendue. Néanmoins, à de fortes doses (à partir de 0,1 µg/ml), les cellules dendritiques $TLR11^{-/-}$, stimulées par la profiline de *T. gondii* sont capables d'activer les lymphocytes spécifiques CD4+. La dépendance vis à vis du TLR11 n'est donc pas stricte et pourrait expliquer ce résultat.

La vaccination ADN permet d'associer au sein d'un même vaccin des molécules d'ADN permettant l'expression de différents antigènes candidats à potentialité vaccinale. Cette démarche permet d'augmenter la protection vis à vis de pathogènes complexes comme *T. gondii*. La profiline de *T. gondii* pourrait entrer dans la composition d'un tel vaccin puisque nous avons démontré que la forme sécrétée de la profiline de *T. gondii* a un effet potecteur.

Evaluation of protective effect of DNA vaccines encoding the *T. gondii* profilin against chronical infection in mice

Dorsaf Hedhli [1], Nathalie Moiré[1], Isabelle Dimier-Poisson [1], Fabrice Laurent[2], Haroon Akbar[1] , Marie Noëlle Mévélec [1*].

(1) Université François Rabelais de Tours, INRA ; UMR 483 Université-INRA Immunologie Parasitaire, Vaccinologie et Biothérapie anti-infectieuse, UFR des Sciences Pharmaceutiques, 31 avenue Monge, 37200 Tours ; IFR136 Agents Transmissibles et Infectiologie, France.

(2) INRA, URIASP1282, Equipe Contrôle et Immunologie des Maladies Entériques du Nouveau-né, Nouzilly, France.

* Corresponding author:

Dr. Marie Noëlle Mévélec, UMR Université-INRA d'Immunologie Parasitaire, Vaccinologie et Biothérapie anti-infectieuse, UFR des Sciences Pharmaceutiques, 37200, Tours, France Tel :+33 2 47 36 71 86, Fax : +33 2 47 36 72 52, e-mail : mevelec@univ-tours.fr

Abstract

Infection with the intracellular protozoan parasite *Toxoplasma gondii* causes serious public health problems and is of great economic importance world-wide. The *T. gondii* profilin, which has been shown to be a potent stimulator of the innate immune system through TLR-11 and an immunodominant antigen in the CD4+ T cell response to the pathogen could be a significant candidate vaccine against toxoplasmosis. In this study, CBA/J mice were intramuscularly vaccinated with DNA plasmid constructs encoding either the secreted or the cytoplasmic form of profilin and the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor as adjuvant. This study shows that DNA encoding secreted profilin elicited specific immune responses, as well as providing significant protection against *T. gondii* chronic infection after oral challenge with *T. gondii* cysts (40% brain cysts reduction). No protection was observed following immunization with DNA encoding the cytoplasmic profilin, despite the induction of a similar humoral response both in terms of magnitude and IgG subclasses as well as a similar Th1 cellular response. However, the cytoplasmic form was less efficacious for efficient T cell response. Similar results in term of immune responses and protection were obtained with a DNA encoding a secreted profilin of *Neospora caninum* which shares 93% homology with *T. gondii* profilin.

1. Introduction

Toxoplasma gondii is one of the most successful protozoan parasite because it has a very broad host range, infecting all warm-blooded animals, including human and causes serious clinical presentations (Montoya and Liesenfeld 2004). There is no 100% effective drug to treat all clinical presentations of *T. gondii*. Available drugs have many side effects and reactivation may occur any time. Furthermore, primary infection with *T. gondii* results in the development of both humoral and cell-mediated immune responses and confers long-term protection. The development of a vaccine, which can prevent the consequence of infection, is therefore, an attractive alternative.

Vaccine strategies against toxoplasmosis aim to induce Th1 response and IFN-γ production because immune protection against *T.gondii* in mice is primarily correlated with Th1 cell mediated immunity (Denkers 2003) and IFN-γ secretion (Denkers and Gazzinelli 1998). IL-12 activates NK cells and T cells to produce IFN-γ, the major mediator of host resistance during the acute and chronic phases of *T. gondii* infection (Yap and Sher 1999). Interleukin-12 is the major cytokine triggering IFN-γ synthesis and IL-$12^{-/-}$ deficient mice succumb to acute toxoplasmosis (Scanga, Aliberti et al. 2002; Kim, Butcher et al. 2006). Among the putative vaccine candidates, profilin-like protein of *T.gondii* and related apicomplexa look promising. The *T. gondii* profilin-like protein (TgPRF) plays an essential role in actin polymerisation by promoting actin assembly at barbed ends. By conditional disruption of the *TgPRF* gene, Plattner et al. showed that *T. gondii* profilin is essential for gliding motility, host cell invasion, active egress from host cells and virulence in mice (Plattner, Yarovinsky et al. 2008). While being an essential element in host cell invasion, *T. gondii* profilin has been shown to be a ligand recognized by Toll-like receptor 11. Through this recognition, conventionnal DC cells (CD8α+) and plasmacytoides DC cells are activated for the production of IL-12 by means of an MyD88-dependent pathway (Yarovinsky, Zhang et al. 2005; Pepper, Dzierszinski et al. 2008). There is now evidence that other apicomplexan protozoan profilins are recognized by TLR11. Specifically, rEA, a recombinant form of a profilin-like protein from *Eimeria tenella* has been shown to have potent anticancer and antiviral activity through robust immune stimulation that occurs via TLR-11 (Rosenberg, Juckett et al. 2005; Gowen, Smee et al. 2006; Julander, Judge et al. 2007). Recently we point out the efficiency of rEA protein to improve protection when used as an adjuvant in vaccination against *T. gondii* (submitted).

The *T. gondii* profilin-like protein has also been described as an immunodominant protein in the CD4+ T cell response to a soluble extract of the tachyzoite stage as well as to live *T. gondii* infection, furthermore, covalent association of profilin to ovalbumine enhanced the immunogenicity of ovalbumin. A strong ovalbumin specific T cells response was induced with the profilin-ovalbumin fusion protein compared to ovalbumine alone or admixed with profilin this enhanced immunogenicity was dependant on TLR-11 signaling (Yarovinsky and Sher 2006).

Intramuscular DNA vaccination that readily elicited a Th1-type response (Pertmer, Roberts et al. 1996) is an attractive vaccine approach against *T. gondii*. Furthermore, a number of approaches are being explored that could enhance the efficacy of DNA vaccines, such as the coadministration of cytokine-encoding plasmids (Kowalczyk and Ertl 1999). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) is a potent cytokine, and its role as a potential vaccine adjuvant has already been investigated (Jones, Stern et al. 1994; Warren and Weiner 2000). Coadministration of plasmid GM-CSF enhances the DNA vaccine elicited humoral and cellular immune responses, as well as protection, in several models including *T. gondii* (Desolme, Mevelec et al. 2000; Ismael, Sekkai et al. 2003; Mevelec, Bout et al. 2005). Furthermore, the co-delivery of GM-CSF by bicistronic plasmid, which allows temporal and spatial codelivery of GM-CSF with antigen, appeared to be a most effective way for enhancing the adjuvant properties of GM-CSF (Xiang and Ertl 1995; Svanholm, Lowenadler et al. 1997; Barouch, Santra et al. 2002).

Many studies have also shown that directing an antigen to different cellular location can alter the character of the immune response to that antigen (Boyle, Koniaras et al. 1997; Lewis, van Drunen Littel-van den et al. 1999; Drew, Lightowlers et al. 2000). In the present study, we addressed the question of whether targeting profilin to different cellular compartments could influence its immunogenicity. DNA vaccine vectors expressing *T. gondii* profilin were constructed with or without fusion to a secretory sequence in a bicistronic vector to get temporal and spatial co-delivery of GM-CSF with secreted or non-secreted form of *T. gondii* profilin. Futhermore, a DNA vaccine vector expressing *Neospora caninum* profilin was constructed with a secretory sequence in the same bicistronic vector because the strong homology (93%; only 5 amino acids are differents) with the *T. gondii* profilin suggested that cross protective immune responses could be induced.

The protection and the immune responses elicited by these vaccines were evaluated in a murine model using CBA/J mice. CBA/J mice are markedly resistant to acute toxoplasmosis infection but susceptible to cyst formation and development of toxoplasmosis encephalitis in chronic infection. As a protective criterion, we chose to evaluate the decrease in brain cyst load, since the number of brain cysts is one of the most important factors that determine the development of toxoplasmic encephalitis (Suzuki, Orellana et al. 1993; Brown, Hunter et al. 1995; Debard, Buzoni-Gatel et al. 1996).

2- Materials and Methods

2.1 Mice

Seven- to eight-week-old female CBA/J (H-2k) inbred mice and female outbred mice (Swiss OF1), were purchased from Janvier, Le Genest Saint-Isle, France. Experiments were performed in accordance to the rules of the Ethic Committee from Tours University.

2.2 Parasites

T. gondii RH tachyzoites were obtained after culture in 75 cm^2 plastic flasks containing human foreskin fibroblastes (HFF) incubated at 37°C under 5% CO_2. Cysts of the 76K strain of *T. gondii* were maintained in the laboratory by passage of infective brain homogenate in CBA/J mice, and used for all experimental infections.

2.3 Preparation of *T. gondii* antigen (TAg). TAg was obtained from *T. gondii* RH tachyzoites and was prepared as previously described (Sharma, Mullenax et al. 1983). Briefly, tachyzoites in Phosphate Buffered Saline (PBS) were sonicated (80 w, 20 min) and centrifuged (3000 rpm, 20 min). The supernatant, which was used as the source of antigen, was recovered and stored in aliquots at -20°C. The concentration was determined by a protein assay reagent kit (Bio-Rad) with bovine serum albumin as the standard.

2.4 Expression and purification of the recombinant secreted profilin (S2-profilin) in Schneider 2 cells

T. gondii profilin cDNA was obtained by PCR amplification by using 2 µl of phage cDNA library (obtained form NIH AIDS Research and reference reagent program). The profilin sequence described by Sahoo et *al*. (Sahoo, Beatty et al. 2006) (Genbank

AY937257.1) was used to design primers. The cDNA fragment was generated by PCR with the forward (5' AGA TCT ATG TCC GAC TGG GAC CCT 3' containing the BglII restriction site (underlined) and the reverse (5' CTC GAG GTA CCC TGA CTG GTG AAG 3' containing the Xho I restriction site (underlined)) primers. The cDNA fragment was first inserted into the pGEM-T easy vector (Promega) and digested with the appropriate restriction enzymes and then cloned into the expression vector pMT/BiP/V5-his A (InVitrogen) previously digestesd with BglII anfd XhoI. The recombinant vector was sequenced to ensure that no substitutions or alterations in the reading frame occurred. The transfection into *Drosophila* Schneider 2 cells was performed with the Drosophila Expression System (DES) purchased from Invitrogen as described Khaznadji, E et *al* (Khaznadji, Boulard et al. 2003). Stable transfection was carried out by adding 1 µg aliquot of the vector pCoHYGRO, that contains hygromycin B gene resistance and 19 µg of recombinant vector to transfect S2 cells. Transfected cell lines were grown in DES culture medium and protein synthesis was induced by the addition of copper sulphate (500 µM final) for 72h. The supernatant was harvested and dialysed overnight at 4°C against PBS then against 20 mM sodium phosphate, 0.5M NaCl, 5mM imidazole buffer, pH 7.4. The supernatant was loaded onto an affinity column HisTrap HP (GE Healthcare) equilibrated in the same buffer. The protein was eluted with phosphate buffer containing 200 mM Imidazole. Purification steps were followed in SDS-PAGE after silver staining as described (Khaznadji, Boulard et al. 2003).

2.5 DNA vaccine constructions

All constructs are based on the eucaryotic expression vector pIRESopt-GMCSF. This vector is a modified version of pIRES (Clontech). The pIRES plasmid (Clontech) allows the simultaneous expression of two genes by cloning them into two separate multiple cloning sites (MCSA and MCSB) located on either side of the internal ribosome entry site (IRES) from the encephalomyocarditis virus (EMCV). Both MCSs and the IRES sequence are downstream the immediate early promoter of cytomegalovirus (CMV). Downstream the second MCS, SV40 polyadenylation signals directs the correct processing of the 3' end of mRNA. To augment the rate of translation initiation at the second position, a modified pIRES plasmid was created and called pIRES-opt (Ismael et al, submitted).The GM-CSF sequence was obtained from the pcDNA3-GM-CSF plasmid (pcDNA3-GM-CSF was kindly provide by Dr. H.C.J. Ertl, Wistar Institute, Philadelphia, PA) by *BamHI* and *XhoI* digestions and treatment with klenow. The fragment was

inserted into the *SmaI* site of the MCSB of pIRESopt to give pIRESopt-GMCSF (pGM-CSF).

Plasmid pIRESopt-Tg-profilin-sec-GMCSF (pTgPRF-sec) was designed to coexpress a secreted *T. gondii* profilin and GM-CSF from the same plasmid. The plasmid pPROMTESTT03hss(Tgondii)vseq (Invivogen) where the IL-2 signal sequence is cloned in-frame with the *T. gondii* profilin was used to amplify both the signal sequence and the *T. gondii*-profilin coding sequence using the forward primer 5'-CGAAGGAGGGCTAGCATGATGTACAGG and the reverse primer 5'-CTGGCCAGCTAGCTTTAGTAC. The amplified DNA fragment was inserted into the *NheI* site of pIRESopt-GMCSF.

Plasmid pIRESopt-Tg-profilin-cyto-GMCSF (pTgPRF-cyt) was designed to coexpress a cytosolic *T. gondii* profilin and GM-CSF from the same plasmid. The *T. gondii* profilin coding sequence was amplified by PCR from the plasmid pPROMTESTT03hss(Tgondii)vseq (Invivogen), using the forward primer 5'-GTCTTGCGCTAGCCACGAATATGTCCGACTGG-3' (NheI site underlined) and the reverse primer 5'-CTGGCCAGCTAGCTTTAGTAC-3' (NheI site underlined). The amplified DNA fragment was inserted into the *NheI* site of pIRESopt-GMCSF.

Plasmid pIRESopt-Nc-profilin-sec-GMCSF (pNcPRF-sec) was designed to coexpress a secreted *N. caninum* profilin and GM-CSF from the same plasmid. The plasmid pPROMTESTT03hss(Ncanin)vseq (Invivogen) where the IL-2 signal sequence is cloned in-frame with the *N. caninum* profilin was used to amplify both the signal sequence and the *N. caninum* profilin coding sequence using the same primers used to clone the secreted *T. gondii* profilin. The constructs were verified by sequencing, the lysine K_{100} codon (AAA) was substituted for arginine R_{100} codon (AGA) in the *T. gondii* profilin sequence.

Plasmids were purified from transformed *E. coli* DH5α by anion exchange chromatography (Endofree plasmid giga kit, Qiagen GmBH), dissolved in sterile endotoxin-free phosphate-buffered saline (Sigma) and stored at -20°C. The integrity of the DNA plasmids was checked by agarose gel electrophoresis after digestion with appropriate restriction enzymes or without digestion (supercoiled form was predominant). DNA concentration was determined by absorbance at 260 nm. The OD 260/280 ratios for purified DNA were 1.80-1.95, indicating that preparations were free of major protein contamination.

2.6 *In vitro* expression of profilins

COS-7 cells, grown in 6-wells plate, were transfected with either pTgPRF-sec, pTGPRF-cyt, pNcPRF-sec or a control plasmid pGM-CSF, using a polycationic liposome reagent (LipofectAMINE^{TM}, GIBCO BRL) as instructed by the manufacturer. In some experiments, tunicamycin (Sigma) was added to cells 24h after transfection, to a final concentration of 4 µg/mL

For immunoblots with transfected cells and TAg (60 µg), SDS-PAGE and immunoblotting were performed as previously described (Hedhli et al, submitted). Cells were harvested 48 h after transfection, and suspended in 150 µl sodium dodecyl sulfate polyacrylamide electrophoresis sample buffer with or without DTT, sonicated and heated at 100°C for 3 min. The separated proteins were probed with a rabbit serum at 1:300 dillution and raised to a recombinant GST-Tg-PRF purified from *E.coli* was used as antifen to raise polyclonal antibodies in rabbit (Plattner, Yarovinsky et al. 2008) and kindly provided by D. Soldati-Favre, University of Geneva, Switzerland. Bound antibodies were detected with alkaline phosphatase-conjugated goat anti-mouse IgG (Sigma). Molecular mass standards (Prestained SDS-PAGE standards, Low range, Bio-Rad) were used.

2.7 *In vivo* induction of IL12p70 by profilins

Transfected cells were harvested 48 h after transfection, suspended in 100 µl PBS, sonicated and analysed by western blot using a rabbit serum raised to *T. gondii* profilin under reducing conditions as described above. Although western blot is not a quantitative assay, we estimated that the amount of antigen expressed by pTgPRF-sec was at least 6 times lower than the amount of antigen expressed by pTgPRF-cyt. Swiss OF1 mice were injected intraperitoneally with 10µL of sonicated transfected pTgPRF-cyt cells diluted in PBS (150µL) or 60 µL of sonicated transfected pTgPRF-sec cells diluted in PBS (150 µL) or 5 µg of S2-profilin diluted in PBS (150µL) without or with 25 µM DTT. Control mice were injected with 60 µL of sonicated transfected pGM-CSF cells diluted in PBS (150 µL) or with 25 µM DTT in 150 µL of PBS. Mouse plasma was collected 7 hours after intraperitoneal administration and assayed for IL-12p70 production using an ELISA kit specific for IL-12p70 (OptEIA set; Pharmingen, San Diego, Calif.).

2.8 Intramuscular immunization

Mice were immunized as previously described (Ismael, Sekkai et al. 2003). Mice were injected using syringes with $30^1/_2$-gauge needles with 100 µl of 10 µM cardiotoxin (Latoxan, Rosans, France): solutions were injected into each tibialis anterior muscle of both hind legs 5 days before DNA immunization, to enhance the uptake of the plasmid (Davis, Michel et al. 1994). On days 0, 14 and 28 these mice were injected with 50 µg of plasmid pTgPRF-cyt, 50 µg of plasmid pTgPRF-sec, 50 µg of plasmid pNcPRF-sec or 50 µg of plasmid pGM-CSF (control group), in 100 µl sterile endotoxin-free PBS (50 µl in each muscle).

2.9 Evaluation of protection against chronic toxoplasmosis

CBA/J mice, were orally infected with 60 cysts of the 76K (type II) obtained from brains of chronically infected mice, 2 weeks after the last immunization. Mice were killed one month after challenge, and their brains were removed. The mouse brains were homogenized with a mortar and pestle in 5 ml of PBS. The cysts were counted microscopically in eight samples (10 µl each) of each brain homogenate. The results are expressed as mean number of cysts per brain ± SD for each group.

2.10 Assessment of the humoral response to DNA immunization

Two weeks after the last immunization, sera were tested for the presence of IgG antibodies against *T. gondii* profilin by ELISA and Western blotting. Briefly for ELISA analysis, the 96 flat-bottom wells of microtiter plates (Maxisorp; Nunc, Roskilde, Danemark) were coated overnight at 4°C with recombinant S2-profilin (2µg/mL). After three washes in PBS containing 0.05% Tween 20 (PBS-0.05% tween 20), nonspecific binding sites were blocked with 4% bovine serum albumin (PBS-4% BSA) for 1h at 37°C. Twofold serial dilutions of serum samples from immunized mice were added to the wells and incubated for 1h30 at 37°C. After three washes in PBS-Tween 20, bound antibodies were detected by incubation for 1h30 at 37°C with a goat anti-mouse IgG-alkaline phopsphate conjugate (Sigma) diluted to 1:5000 in PBS 4%-BSA. After the plates were washed in PBS-Tween 20, the bound phosphatase activity was measured with p-nitrophenylphosphate at 1mg/ml in 1M diethanolamine buffer (pH 9.8). After incubation for 30min at room temperature, the OD_{405} of each sample was read in a Wallac Victor 2 counter plate reader (Perkin Elmer-France). For Western blotting analysis,

tachyzoites were boiled in SDS-PAGE sample buffer and separated on 10% polyacrylamide gels, transfered to nitrocellulose membrane and probed with pooled sera as previously described (Hedhli et al, submitted).

2.11 Determination of the anti-*T. gondii* IgG subclass

The anti-profilin IgG subclass was determined by ELISA as described above, except that the peroxidase-conjugated anti-mouse IgG1, IgG2a (Sigma, Germany) were used at 1:1000 in PBS-4%BSA. The bound peroxidase activity was revealed with tetramethylbenzidine ready to use (TMB) (Sigma). After incubation for 30min at room temperature in the dark, followed by addition of 2 N H_2SO_4 (50 µL) to stop the reaction, the OD_{450} of each sample was read in a Wallac Victor 2 counter plate reader (Perkin Elmer-France).

2.12 Cytokine assays

Three mice from each group were killed 6 days after the last immunization and their spleens were removed . Splenocytes stimulation were assayed as described previously (Ismael, Sekkai et al. 2003). Cells were stimulated with 4 µg/mL of recombinant S2-profilin, or with 10µg /mL of concanavalin as positive control or medium alone. Cell-free supernatants were harvested and assayed for interleukin-4 (IL-4) activity at 24h, IL-2 activity at 48h, IL-10 activity at 72h and gamma interferon (IFN-γ) activity at 96h. The concentrations of all cytokines were determined with ELISA kit (OptEIA set; Pharmingen, San Diego, Calif.) as specified by the manufacturer. The sensitivity limits for the assays were 10 pg/ml for IL-2 and IL-4, 20 pg/ml for IFN-γ, and 50 pg/ml for IL-10.

2.13 Statistical analysis

Levels of significance of the differences between groups of mice were determined with Student's test using GraphPad Instat 2.1 software.

3. Results

3.1. Expression of profilin proteins encoded by the DNA vaccines

We generated three different plasmid contructs encoding simulteanously the GM-CSF and a secreted form of *T. gondii* profilin (pTgPRF-sec), a cytoplasmic form of *T. gondii* profilin (pTgPRF-cyt) or a secreted form of *N. caninum* profilin (pNcPRF-sec). The abitlity to express profilin from the three plasmid constructs was investigated by transfecting COS cells. Each of the recombinant construct, pTgPRF-sec, pTgPRF-cyt, pNcPRF-sec expressed profilin transiently as detected by western blot of lysed cells under non reducing conditions using a rabbit antiserum raised to *T. gondii* profilin (Fig 1). Due to the high homology (93%) with the *T. gondii* profilin, the *N. caninum* profilin expressed in pNcPRF-sec transfected COS cells is recognized by the rabbit antiserum raised to *T. gondii* profilin.

A major band of 28 kDa is recognized by the TgPRF-specific rabbit serum in the cell lysate of pTgPRF-cyt transfected cells whereas a band of the same molecular mass as well as larger bands are recognized in the cell lysates of both pTgPRF-sec transfected cells and pNcPRF-sec transfected cells. These larger bands may correspond to multimers of the profilin and possibly may correspond to a dimer for the band of about 54 kDa. Futhermore, a faint band of about 32 kDa is recognized in the cell lysates of both pTgPRF-sec transfected cells and pNcPRF-sec transfected cells. All these bands are not recognized in the cell lysate of control pGM-CSF transfected cells. The secreted forms of profilins may be glycosylated since the *T. gondii* and *N. caninum* profilins possess a N-linked glycosylation site ($N_{128}G_{129}S_{130}$) which may explain the 32 kDa band. Furthermore, multimerization may occur through the formation of sulfudryl bonding via the five internal cysteins ($C_{18} - C_{19} - C_{62} - C_{107} - C_{114}$). To evaluate these hypothesis, tunicamycin was added to the culture medium following transfection of COS cells with pTgPRF-sec, pTgPRF-cyt or pNcPRF-sec to inhibit the glycosylation process and western blot were performed under reducing conditions with dithiothreitol (DTT) in order to break SH bonds.

By western blot using the TgPRF-specific rabbit serum, under reducing conditions and cells transfected without tunicamycin (Fig 2), a band with a molecular mass of 28 kDa is detected in the cell lysate of COS cells transfected with pTgPRF-cyt which co-migrates with the band recognized in the *T. gondii* lysate which corresponds to the native *T. gondii* profilin. In the cell lysates of COS cells transfected with either pTgPRF-sec or pNcPRF-

sec, the same band of about 28 kDa is recognized as well a second band of about 32 kDa. This second band is not detected in the *T. gondii* lysate and in the lysate of pTgPREF-cyt transfected cells. Larger bands are not detected under reducing conditions, indicating that disulfide bonds are implicated in their formation. The second band of about 32 kDa is a glycosylated form of the profilin since this band clearly diminished when the glycosylation process is inhibited with tunicamycin treatment. As expected, the tunicamycin treatment has no effect on the expression of the cytosolic form of the profilin. Although western blot is not a quantitative assay, the amount of antigen expressed by the cells transfected with pTgPRF-sec and pNcPRF-sec was less than the amount of antigen expressed by the cells transfected with pTgPRF-cyt. Cells transfected with control plasmid (expressing only mice GM-CSF) do not express any protein recognized by the TgPRF-specific rabbit serum as showed by the westen blot (Fig 2). In conclusion the profilin expressed by pTgPRF-sec and pNcPRF-sec plasmid constructions was glycosylated and ready to be secreted whereas pTgPRF-cyt plasmid construction express a *T. gondii* profilin which remains in the cytoplasm of the transfected cells. In order to evaluate the expression of the secreted profilins by the DNA vaccine vectors, western blot were performed with the supernatants of transfected cells. The secreted form of the *T. gondii* profilin was not detected under our experimental conditions in the supernatants of cells transfected with pTgPRF-sec (data not shown). However, a faint band that seems lower than the glycosylated form and larger than the cytosolic form detected in the corresponding lysate, was observed (Fig 3) in the supernatant of cells transfected with pNcPRF-sec. This band may correspond to the glycosylated form without the leader sequence.

Figure 1:

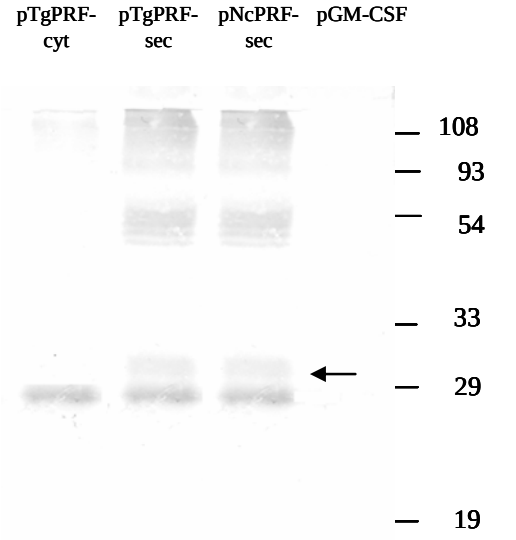


Fig 1. Transient expression of Profilin by DNA vaccine vectors in COS cells. Cell lysates of COS transfected with various DNA vectors were analysed by Western blot using a rabbit TgPRF specific serum. Sizes of molecular weight markers are shown on the right in kilo-daltons.

Figure 2:

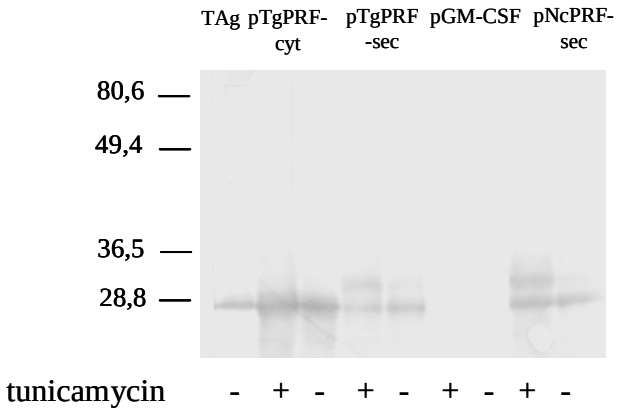


Fig 2 . Transient expression of profilin by DNA vaccine vectors in COS cells after treatment with or without tunicamycin. Cell lysates of COS cells transfected with the indicated plasmids are analysed by Western blot under reducing conditions using a TgPRF specific rabbit serum.

TAg:*T.gondii* antigen (60 µg). Sizes of molecular weight markers are shown on the left in kilo-daltons.

Figure 3

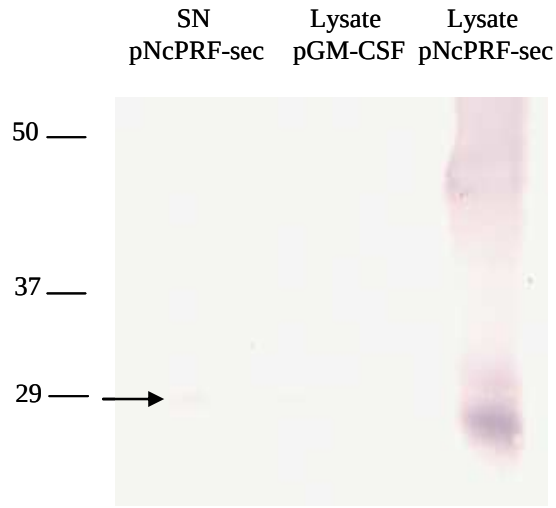


Fig 3. Transient expression of profilin by pNcPRF-sec vector in COS cells. Analysis was performed by western blot using a *TgPRF* specific rabbit serum. Supernatant and cell lysates of COS cells transfected with the indicated plasmids are analysed by Western blot under non reducing conditions using a TgPRF specific rabbit serum.

3.2. Expression and purification of the recombinant secreted *T. gondii* Profilin in Schneider 2 cells (S2-profilin)

The *T. gondii* profilin was previously characterized as a minor component in the parasite (Yarovinsky, Zhang et al. 2005). In order to analyse the immune responses following immunization, we choose to get a recombinant *T. gondii* profilin, expressed in an eucaryotic system which avoid bacterial endotoxin contamination. Drosophila Schneider 2 cells were stably transfected with a vector which allows the expression of a secreted His-V5-tagged *T. gondii* profilin (S2-profilin) upon induction with $CuSO_4$.

The recombinant S2-profilin expression in Drosophila Schneider 2 cells supernatant was analysed by western blot first in non reducing conditions. As expected, S2-Profilin was detected with anti-V5 antibodies in the supernatant of the transfected cells after 72 h post-induction with $CuSO_4$ (Fig.4A) and was not detected in non-induced supernatant of transfected cells. The 36 kDa molecular mass of the detected S2-Profilin is more important than the expected 28 kDa molecular mass. This increase in the molecular mass of the detected S2-Protein is due to the glycosylation on the one hand and to the V5-histidine Tag on the other hand. A second band with a molecular mass of about 70 kDa is detected in the supernatant of the induced transfected cells and appears to be the result of the multimerization of the S2-Profilin protein. To confirm this result, dithiothreitol (DTT) was added to the supernatants of induced and non-induced transfected cells to reduce sulfudryl bonds. Only one band of about 36 kDa molecular mass was detected in the supernatant of the transfected cells after 72 h post-induction with $CuSO_4$. In conclusion, *T.gondii* Profilin is present in the supernatant of transfected drosophila cells in a multimeric most prominent form.

Analysis of crude supernatants from induced (72 h post induction) and non-induced transfected cells under reducing conditions by silver staining after polyacrylamide gel separation, did not show any difference suggesting that the recombinant profilin is not produced in large amounts (Fig 4B). Analyse of the purified S2-Profilin after electrophoresis under reducing conditions, followed by silver staining, showed that the S2-profilin is not pure, however the major contaminants are eliminated. The larger bands revealed by the silver staining did not react with the anti-V5 antibodies (Fig4C). The concentration of the S2-Profilin in the culture medium was about 5 mg/L.

Figure 4

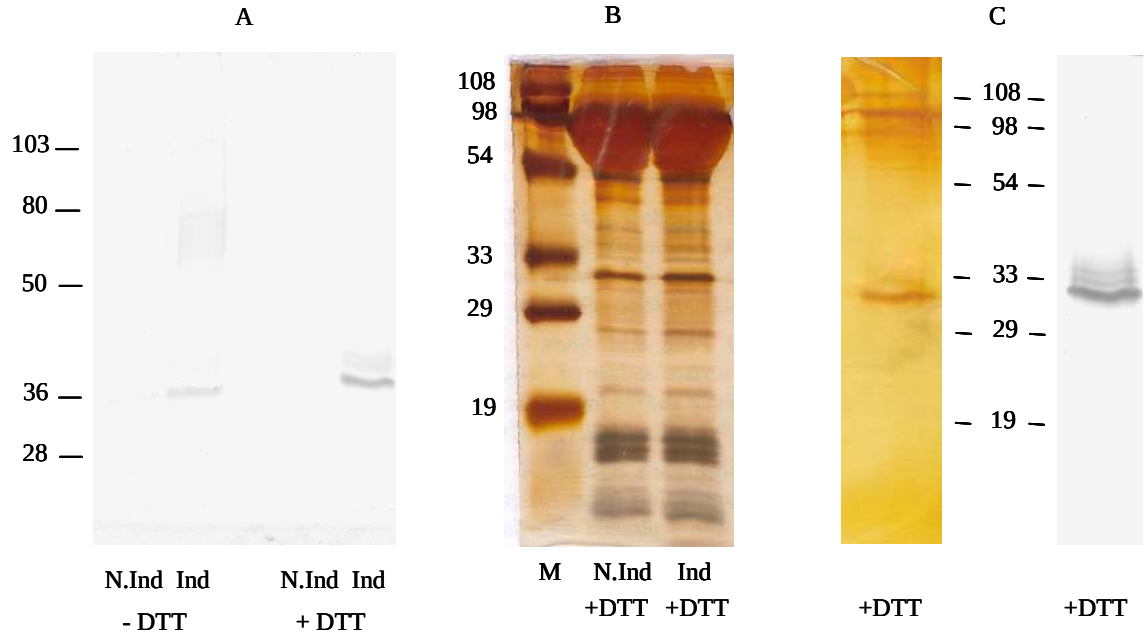


Fig.4 Production and purification of the recombinant secreted *T.gondii* profilin protein (S2-profilin) cloned in drosophila cells

A, Western Blot analysis of Drosophila cell supernatant after induction or not of *T.gondii* profilin protein production with CuSO4, detection was performed with anti-V5 antibodies. Under non reducing conditions, the 36 kDa detected band correspond to the profilin protein with the histidine Tag and V5 Tag. The detected band of 70 kDa molecular mass is due to the multimerization of the profilin protein. Under reducing condition (DTT) only the monomeric form is detected; B, Supernatant analysis of induced and non induced drosophila cells to produce *T.gondii* profilin: SDS-PAGE electrophoresis followed by silver nitrate staining are used, no detectable profilin protein in cells induced supernatant when compared to non induced one; C, Analysis of the profilin protein elution using 200µM of imidazol was performed by SDS-PAGE electrophoresis followed by silver nitrate staining. C, the corresponding Western Blot analysis, for protein detection, anti-V5 antibodies are used .

3.3. *in vivo* IL-12p70 production by *T. gondii* profilins

We then analysed the ability of the *T. gondii* profilins expressed by the DNA vaccine constructs and the S2-profilin to induce IL-12p70 *in vivo* (table 1). Mouse serum samples were assayed for IL-12p70 production 7 h after injection by intraperitoneal route of sonicated cells transfected with either pTgPRF-cyt, pTGPRF-sec or pGM-CSF, or reduced or unreduced S2-profilin. High serum IL-12p70 levels (114-568 ng/ml) were observed in mice injected with pTgPRF-cyt transfected cells containing the cytoplasmic *T. gondii* Profilin. Serum IL-12p70 levels (64.7-30 ng/ml) were also observed in mice injected with pTgPRF-sec transfected cells containing the cytoplasmic and the glycosylated forms of *T. gondii* Profilin. Injection of the secreted purified S2-profilin did not induce the production of detectable levels of IL-12p70 in mice. However, serum IL-12p70 levels were observed in mice injected with the reduced secreted purified S2-profilin (44.5-10 ng/ml). Sera of mice injected with sonicated cells transfected with pGM-CSF or with 25 µM DTT in PBS did not show any specific IL-12p70 production. These results indicate that only the monomeric form of *T. gondii* profilin induced rapidly and effectively plasma levels of IL-12p70.

Table1. IL-12 production (ng/ml) in mice sera 7 hours after intraperitoneal treatment with *T. gondii* profilins reduced or not by DTT.

Groupa	pTgPRF-cyto		pTgPRF-sec		S2PRF		pGM-CSF		DTT	
	Mouse1	mouse2	mouse1	mouse2	mouse1	mouse2	mouse1	mouse2	mouse1	mouse2
-DTT	114	568	64,7	56,7	ND	ND	0	ND		
+DTT					44,5	10	ND	ND	ND	ND

[a]Mice were injected with sonicated cells transfected with pTgPRF-cyt or pTgPRF-sec or with 5µg of purified S2-profilin with or without 25µM DTT. Control mice were injected with sonicated cells transfected with pGM-CSF or 25µM DTT in PBS.

3.4. Effective protection with pTgPRF-sec or pNCPRF -sec but not with pTgPRF-cyt

To test whether immunization with pTgPREF-sec, pTgPRF-cyt or pNcPRF-sec induced effective protection against *T.gondii* infection, the mice were immunized three times at 2 week intervals with 50 µg of each plasmid or a control plasmid (pGM-CSF) and were orally challenged with 70 cysts of *T.gondii* 76K strain 2 weeks after the last immunization. One month after the oral challenge, the cysts in the brains of mice were counted (Fig 5). Significant protection was obtained in the mice immunized with secreted profilin constructions (pTgPRF-sec and pNcPRF-sec), which had 40% fewer brain cysts than did mice immunized with pGM-CSF (2467±659 and 2403±742 cysts respectively versus 4077±1860 cysts). In contrast mice immunized with pTgPRF-cyt are not protected and present high brain cyst load like control mice. These results demonstrated the protective effect of the secreted profilin proteins but not the cytoplasmic one against *T.gondii* infection.

Figure 5

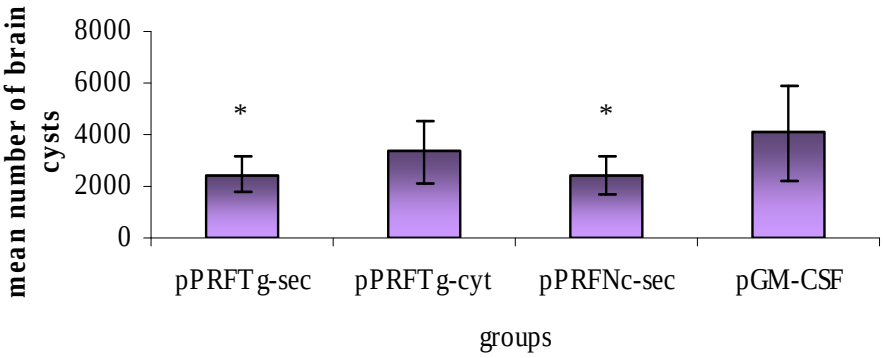


Fig. 5. Detection of specific anti-*T.gondii* IgA antibodies by ELISA in intestinal washes from six immunized mice with TAg alone or combined with rEA by the nasal route. The cut-off value (0.446) was calculated as the mean of five intestinal washes from untreated mice + 3 standard deviations. The horizontal solid line indicates positive cut-off. Results are for five to six mice per group compiled from two experiments.

3.5. Evaluation of the humoral immune response after DNA immunizations

Immunoblot analysis showed that pooled sera from mice immunized three times by the intramuscular route with pTgPRF-sec, pTgPRF-cyto and pNcPRF-sec contained IgG antibodies directed against a *T. gondii* antigen with an apparent molecular mass of 28 kDa which showed a migration pattern similar to that of the *T.gondi* profilin detected by the TgPRF-specific rabbit serum (Fig 6). These bands were not detected by IgG antibodies from mice injected with pGM-CSF. To determine the levels of antibody titers, all sera were tested by ELISA using S2-profilin (Fig 7). After the third immunization, no difference in IgG antibody titers was shown between immunized group. In conclusion, intramuscular immunization with pTgPRF-sec, pTgPRF-cyt or pNcPRF-sec induced specific and high IgG response against *T.gondii* profilin.

Figure 6

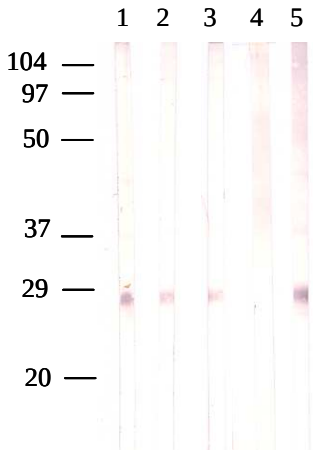


Fig 6. Immunoblot analysis of humoral response (IgG) at day 35 following the third DNA immunization of CBA/J mice with different DNA constructs. *T. gondii* lysate was electrophoresed in a 10% SDS-polyacrylamide gel under non-reducing conditions, transferred to nitrocellulose and probed with pooled of sera from mice immunized with pTgPRF-sec (1), pTgPRF-cyt (2), pNcPRF-sec (3), and pGM-CSF(4). Sera were diluted at 1/50. A TgPRF specific rabbit serum is used as a positive control (5). The results are representative data of two experiments.

Figure 7

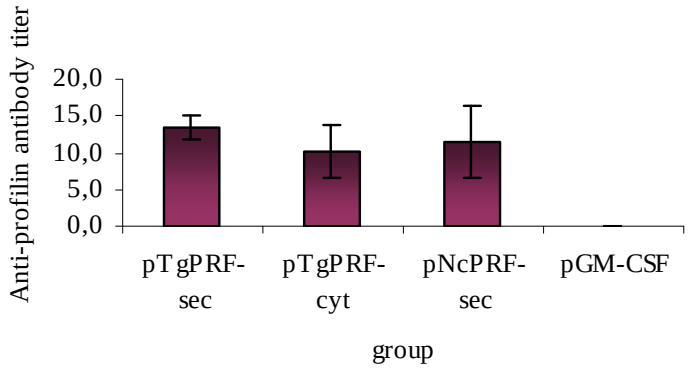


Fig. 7. Cellular response of splenocytes from CBA/J mice immunized by the nasal route with TAg alone, rEA alone or TAg combined with rEA, after stimulation by TAg (A) or rEA (B).

Mice were immunized with 15µg of TAg alone or combined with 1µg of rEA on days 0, 14 and 28 by the nasal route. Splenocytes were recovered 3 weeks after the last immunization

and cultured with 10 µg/ml TAg (A) or 2µg/ml rEA (B).

The results are representative data of two experiments.

3.6. Cytokine productions in supernatants of splenocytes culture after DNA immunizations

Culture supernatants of splenocyte cells of immunized mice were analysed for cytokine productions (Fig 8). Compared to the control group immunized with pGM-CSF, splenocytes from three mice (3/3 analysed) immunized with pTgPRF-sec and splenocytes from three (3/3 analysed) mice immunized with pNcPRF-sec, stimulated with S2-profilin, produced specific amounts of IL-2. Whereas, splenocytes from one (1/3 analysed) mouse immunized with pTgPRF-cyt produced specific amounts of IL-2. The same results were observed for IFN-γ production with greater individual variability. Compared to the control group immunized with pGM-CSF, splenocytes from three mice (3/3 analysed) immunized with either pTgPRF-sec or pNcPRF-sec produced specific amounts of IFN-γ but only splenocytes from one mouse immunized with pTgPRF-cyt produced specific amounts of IFN-γ. No specific release of IL-10 was observed and IL-4 (data not shown) was not detected in any group. In our experimental conditions, secreted constructs (pTgPRF-sec and pNcPRF-sec) upregulate pro-inflammatory cytokines and have no effect on IL-10 and IL-4 production. Secreted profilin proteins seem to induce a Th1 response. However, the cytoplasmic construct is less efficient to induce a Th1 immune response since in our experimental conditions activated T cells occurred only in some mice.

3.7 Specific anti-*T. gondii* profilin IgG subclass

We were also interested in finding whether a Th1 and/or Th2 humoral response to *T. gondii* profilin was generated after immunization with constructs expressing secreted or cytoplasmic forms of profilin proteins. Therefore we analysed the distribution of IgG subtypes IgG1 and IgG2a directed against S2-profilin (Fig 9). Both IgG1 and IgG2a were found in the sera of mice immunized with pTgPRF-sec, pTgPRF-cyt or pNcPRF-sec with the same ratio (IgG2a/IgG1: 1.2; 1.25 and 1.28 respectively) for each group indicating a mixed Th1/Th2 humoral immune response.

Figure 8

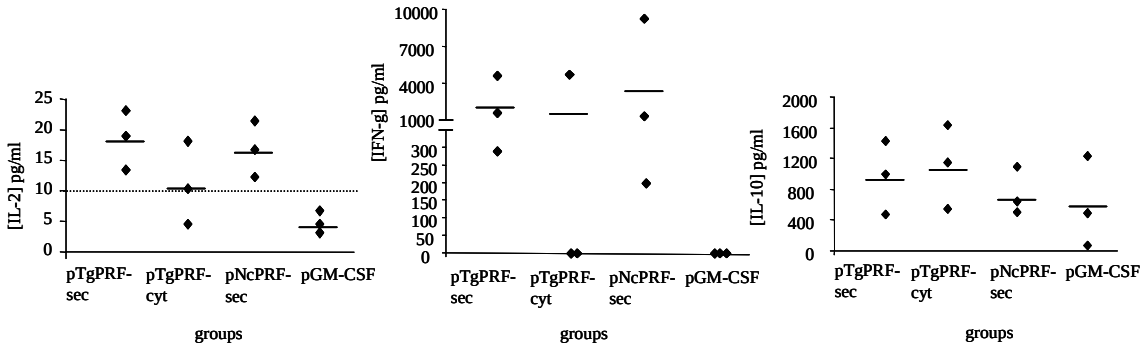


Fig. 8. Cellular response of splenocytes from CBA/J mice immunized with pTgPRF-sec, pTgPRF-cyt, pNcPRF-sec or pGM-CSF after stimulation with S2-profilin. Mice were immunized with 50µg of pTgPRF-sec, pTgPRF-cyto, pNcPRF-sec or pGM-CSF on days 0, 14 and 28. Splenocytes were recovered 2 weeks after the last immunization and cultured with 2 µg/ml of S2-profilin.

The results are representative data of two experiments.

Figure 9

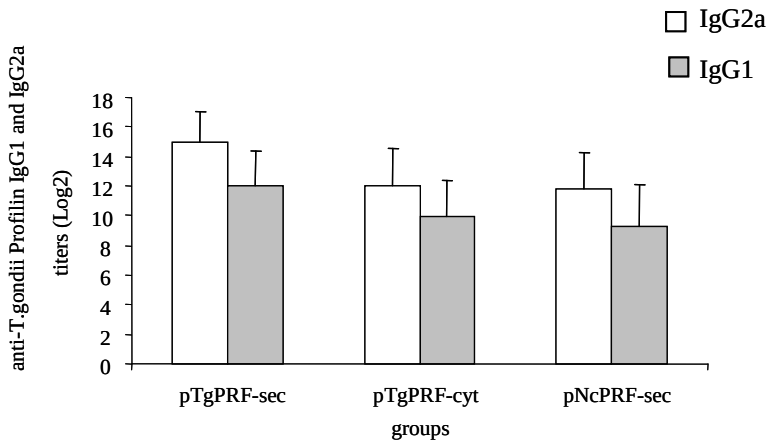


Fig. 9 Determination of specific anti-T. gondii profilin IgG1 and IgG2a titers in the sera of CBA/J mice immunized with 50µg of pTgPRF-sec, pTgPRF-cyt, pNcPRF-sec or pGM-CSF on days 0, 14 and 28 by intramuscular route. Sera were collected on day 35 and tested by ELISA using S2-profilin. The titer is given as the reciprocal of the highest dilution with an OD405 that was 2.5-fold greater than the OD of untreated mouse sera at the same dilution. Results are expressed as the mean log2 titers and SD and are representative of two experiments. No significant differences was observed betwen different groups.

4. Discussion

This study shows that DNA vaccines expressing secreted Profilin of *T.gondii* or *N.caninum* elicit specific immune responses, as well as providing significant protection against *T. gondii* following intramuscular injection (40% brain cysts reduction). No protection was observed following immunization with a DNA vaccine expressing the cytoplasmic profilin of *T. gondii*, despite the induction of a similar humoral response both in terms of magnitude and IgG subclasses as well as a similar Th1 cellular response. However, the cytoplasmic form was less efficacious for efficient T cell priming.

GM-CSF enhances the DNA vaccine elicited humoral and cellular immune responses, as well as protection in many models. The efficiency of the GM-CSF used as an adjuvant in combination with several antigens of *T. gondii* (SAG1, GRA4, MIC3) in DNA vaccines against acute, chronical and congenital toxoplasmosis in mice has already been investigated (Desolme, Mevelec et al. 2000; Ismael, Sekkai et al. 2003; Mevelec, Bout et al. 2005). The mechanism underlying the adjuvant properties of plasmid encoding GM-CSF involves increased recruitment and activation of macrophages and dendritic cells at the site of injection (Bowne, Wolchok et al. 1999; Haddad, Ramprakash et al. 2000; Kim, Yang et al. 2000). All these properties support the use of plasmid encoding GM-CSF as an adjuvant vaccine in this study. Futhermore, the antitumor efficacy in mice of a recombinant profilin-like of *Eimeria* was enhanced by co-administration of GM-CSF (Rosenberg, Juckett et al. 2005).

The choice of profilin as a potential candidate vaccine was based on its ability to stimulate the innate immune system through TLR-11 as well as its unusual immunogenicity, promoting IFN-γ-producing CD4+ T cells, the latter property being dependent on both TLR recognition and signaling through MyD88 (Yarovinsky, Kanzler et al. 2006)Yarovinsky , Kanzler et al, 2006). There is now evidence that related profilin of *T.gondii* of other apicomplexan protozoa like *N. caninum* profilin are recognized by TLR11 (Yarovinsky and Sher 2006). Therefore, the profilin of *N. caninum* which shares 93% of homology in amino acid sequence with *T.gondii* profilin was included in this study.

Profilin of *T.gondii* was described as a potent inducer of IL-12 production and of T cell priming despite its cytosolic localisation in the tachyzoite (Yarovinsky, Zhang et al. 2005). However, because the cellular localisation of antigen influences both the cellular and the humoral responses after DNA immunization (Boyle, Koniaras et al. 1997) we develop constructs expressing two forms of profilin proteins. pTgPRF-sec and pNcPRF-

sec express secreted forms of *T gondii* profilin and *N. caninum* profilin respectively, because of the presence of a murine IL-2 signal peptide before the insert. pTgPRF-cyt expresses an intracellular form of *T.gondii* profilin, the natural localization of the protein. To analyse the immune responses we also produced a recombinant *T. gondii* secreted profilin (S2-profilin) in Schneider 2 cells.

The expression of the profilins was characterized *in vitro* by transfection of COS cells. It was clearly demonstrated that both forms of *T. gondii* profilins as well as the secreted form of *N. caninum* were expressed in cell lysates of transfected cells. However, only the secreted form of *N. caninum* profilin could be detected in the supernatant. Considering that the sequences of *T. gondii* profilin and *N. caninum* profilin were cloned in the same plasmid, that the expression was driven by the same promoter, that the protein sequences are almost the same (only 5 different amino acids), we assume that the secreted *T. gondii* profilin was not detected due to lower amounts of the expressed protein in the supernatant rather than differences in protein secretion.

A recombinant profilin with an apparent molecular weight indistinguishable from that of the protein found in the parasite was expressed in cell lysates of COS cells transfected with

pTgPRF-cyt, pTgPRF-sec and pNcPRF-sec. An additionnal recombinant protein with a higher molecular mass than expected was also expressed in cell lysates of COS cells transfected with pTgPRF-sec or pNcPRF-sec, this is due to post-translational modifications, e.g., N-glycosylation. Thus, consistent with the presence of a functional signal sequence in the constructs, proteins expressed from pTgPRF-sec or pNcPRF-sec are targeted to the ER to undergo post-translational maturation especially glycosylation. When manipulating an intracellular protein for export out of the cell, one could expect evidence of instability in the protein. The secreted form of profilins showed no signs of degradation under our experimental conditions, however expression levels seemed lower than the cytoplasmic form.

The N-glycosylation as well as the folding differences due to formation of disulfide bonds with regard to immunogenic power may have mask or altered epitopes and/or the binding site to TLR11 of the secreted forms of profilins. Both the non-glycosylated and glycosylated forms of profilin under reduced and non reduced conditions as well as multimeric forms under non reduced conditions, expressed in the lysates of cells transfected with pTgPRF-sec and pNcPRF-sec, are recognized by a rabbit serum raised to *T. gondii* profilin suggesting that the glycosylation of the secreted profilin and

conformational changes due to disulfide bonds don't influence the immunoreactivity of the profilin. In the same way, others have shown that the glycosylation of the expressed *T. gondii* SAG1 has little influence on the immunoreactivity of the molecule (Jondal, Schirmbeck et al. 1996). Futhermore the glycosylation has no effect on the induction *in vivo* of IL-12 production whereas disulfide bonds have a negative effect because *in vivo* induction of IL-12 was detected only after DTT treatment of the secreted S2-profilin.

Upon intramuscular immunization, protein expression is due at least in part to the transfected myocytes. Myocytes express MHC class I at low levels and do not constitutively express class II or co-stimulatory molecules such B7 (Hohlfeld and Engel 1994). Transfected myocytes could process antigen, then cytosolic antigen could readily access the MHC I presentation patways, however, studies have shown that cross-priming is a major mechanism for CD8+ T cells priming (Corr, Lee et al. 1996; Doe, Selby et al. 1996). Myocytes act merely as a source of antigen and priming occurs in the draining lymph node. Optimum immune induction would result if the antigen is released from the myocyte by secretion or subsequent to cell damage. We used cardiotoxin to enhance the DNA plasmid uptake which also induced recruitment of APC at the injection site, so it is possible that low level transfection of APC occurs at the injection site and these APC then traffic to lymphoid organs and present the encoded antigen to B and T cells. Many studies have shown that in general, plasmid encoding a secreted form of an antigen induced stronger humoral immune responses than the plasmid encoding a non-secreted form of this antigen) for examples: ovalbumin (Boyle, Koniaras et al. 1997), HCV core (Inchauspe, Vitvitski et al. 1997), Herpes simplex virus-glycoprotein D (Strasser, Arnold et al. 2000), Taenia ovis 45W (Drew, Lightowlers et al. 2000); Streptococcus pneumoniae-PspA (Ferreira, Miyaji et al. 2006). By using adoptive transfer of fluorescently labelled antigen-specific TCR transgenic T cells, Rush et al (2002) studied the priming and proliferation of naïve T cells in the first days following intramuscular DNA administration. They showed that secreted antigen was more efficacious for inducing proliferation of $CD4^+$ T cells than cytosolic antigen. Futhermore, they demonstrated that simple construct manipulation, such as inclusion of an intron to increase gene expression, also influence the efficiency of T cell priming (Rush, Mitchell et al. 2002). In our experimental conditions, although the differential protein targeting within the transfected cell did not have major effect on humoral response *in vivo* as reflected by similar antibody responses elicited in mice after immunization with either plasmid, the cytoplasmic form appeared less efficacious for inducing T cell response. If as

observed *in vitro* on western blot, the amount of protein expressed *in vivo* by the plasmids encoding the secreted forms of profilin is lower than expected, compared to the cytoplasmic form, this could account for the results obtained. Futhermore, the fact that the secreted profilins are able to form multimers and that such multimers are unable to induce Il-12 production may also impair the immunogenicity of these constructs. However, the immunogenicity of profilin may not entirely depend on TLR11 recognition because CD8α+ DC from naïve *Tlr11*$^{-/-}$ mice incubated with high doses of *T. gondii* profilin (0.1 µg/mL) are able to activate profilin-specific CD4+ T cells (Yarovinsky, Kanzler et al. 2006). The cellular localization of profilins did not affect the cytokine pattern as well as the subclass profil of the antibody response. Both IgG2a and IgG1 were generated whatever the plasmid construct used with a slight predominance of IgG2a antibodies. Considering the ability of *T.gondii* profilin to stimulate the innate immune response through TLR-11 recognition and to trigger specific IFN-γ-producting CD4+ T cells, one could expect a high predominance of IgG2a antibodies. This was not the case even with the plasmid encoding the cytoplasmic form of *T. gondii* profilin. It would be interesting to immunize mice with S2-profilin, which did not induce *in vivo* IL-12 production, to evaluate the effect on the subclass profil of the antibody response. However the splenic cellular response was associated with the production of IFN-γ and IL-2, indicating that this was a Th1-type response. Lewis et al (1999) found that the cell compartment in which the antigen is expressed has little impact on the overall splenic cytokine profiles and that cytokines from the draining iliac node more accurately reflected the predominant serum isotype which differed with the cellular compartment of the expressed antigen (Lewis, van Drunen Littel-van den et al. 1999). Analysis of the cytokine profiles of cells isolated from the iliac lymph node would therefore be valuable to complete the analysis.

In conclusion, this study shows that a plasmid DNA encoding the secreted form of *T. gondii* profilin induced a specific humoral and cellular immune responses, as well as an effective significant protection in immunized CBA/J mice. Accumulating evidence indicates that multi-antigen immunizations are needed for the development of an effective vaccine against complex pathogens such as parasites (Ivory and Chadee 2004).

Therefore the results presented here demonstrated that the profilin of *T. gondii* should be a component in the development of a multiantigenic vaccine against toxoplasmosis.

5. Acknowledgments

This work was supported by the French Embassy and French cooperation Institut at Tunisia. We would like to thank J. Pierre, T. Papin and S. Bigot for their excellent technical assistance. We thank Dr D. Soldati, University of Geneva, Switzerland, for providing a rabbit serum raised to *T. gondii* profilin. The *Toxoplasma gondii* cDNA library was obtained through the AIDS Research and Reference Reagent program, Division of AIDS, NIAID, NIH .

6. References

- Barouch, D. H., S. Santra, et al. (2002). "Potent CD4+ T cell responses elicited by a bicistronic HIV-1 DNA vaccine expressing gp120 and GM-CSF." J Immunol **168**(2): 562-8.

- Bowne, W. B., J. D. Wolchok, et al. (1999). "Injection of DNA encoding granulocyte-macrophage colony-stimulating factor recruits dendritic cells for immune adjuvant effects." Cytokines Cell Mol Ther **5**(4): 217-25.

- Boyle, J. S., C. Koniaras, et al. (1997). "Influence of cellular location of expressed antigen on the efficacy of DNA vaccination: cytotoxic T lymphocyte and antibody responses are suboptimal when antigen is cytoplasmic after intramuscular DNA immunization." Int Immunol **9**(12): 1897-906.

- Brown, C. R., C. A. Hunter, et al. (1995). "Definitive identification of a gene that confers resistance against Toxoplasma cyst burden and encephalitis." Immunology **85**(3): 419-28.

- Corr, M., D. J. Lee, et al. (1996). "Gene vaccination with naked plasmid DNA: mechanism of CTL priming." J Exp Med **184**(4): 1555-60.

- Davis, H. L., M. L. Michel, et al. (1994). "Direct gene transfer in skeletal muscle: plasmid DNA-based immunization against the hepatitis B virus surface antigen." Vaccine **12**(16): 1503-9.

- Debard, N., D. Buzoni-Gatel, et al. (1996). "Intranasal immunization with SAG1 protein of Toxoplasma gondii in association with cholera toxin dramatically reduces development of cerebral cysts after oral infection." Infect Immun **64**(6): 2158-66.

- Denkers, E. Y. (2003). "From cells to signaling cascades: manipulation of innate immunity by Toxoplasma gondii." FEMS Immunol Med Microbiol **39**(3): 193-203.

- Denkers, E. Y. and R. T. Gazzinelli (1998). "Regulation and function of T-cell-mediated immunity during Toxoplasma gondii infection." Clin Microbiol Rev **11**(4): 569-88.

- Desolme, B., M. N. Mevelec, et al. (2000). "Induction of protective immunity against toxoplasmosis in mice by DNA immunization with a plasmid encoding Toxoplasma gondii GRA4 gene." Vaccine **18**(23): 2512-21.

- Doe, B., M. Selby, et al. (1996). "Induction of cytotoxic T lymphocytes by intramuscular immunization with plasmid DNA is facilitated by bone marrow-derived cells." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(16): 8578-83.

- Drew, D. R., M. W. Lightowlers, et al. (2000). "A comparison of DNA vaccines expressing the 45W, 18k and 16k host-protective antigens of Taenia ovis in mice and sheep." Vet Immunol Immunopathol **76**(3-4): 171-81.
- Ferreira, D. M., E. N. Miyaji, et al. (2006). "DNA vaccines expressing pneumococcal surface protein A (PspA) elicit protection levels comparable to recombinant protein." J Med Microbiol **55**(Pt 4): 375-8.
- Gowen, B. B., D. F. Smee, et al. (2006). "Recombinant Eimeria protozoan protein elicits resistance to acute phlebovirus infection in mice but not hamsters." Antimicrob Agents Chemother **50**(6): 2023-9.
- Haddad, D., J. Ramprakash, et al. (2000). "Plasmid vaccine expressing granulocyte-macrophage colony-stimulating factor attracts infiltrates including immature dendritic cells into injected muscles." J Immunol **165**(7): 3772-81.
- Hohlfeld, R. and A. G. Engel (1994). "The immunobiology of muscle." Immunol Today **15**(6): 269-74.
- Inchauspe, G., L. Vitvitski, et al. (1997). "Plasmid DNA expressing a secreted or a nonsecreted form of hepatitis C virus nucleocapsid: comparative studies of antibody and T-helper responses following genetic immunization." DNA Cell Biol **16**(2): 185-95.
- Ismael, A. B., D. Sekkai, et al. (2003). "The MIC3 gene of Toxoplasma gondii is a novel potent vaccine candidate against toxoplasmosis." Infect Immun **71**(11): 6222-8.
- Ivory, C. and K. Chadee (2004). "DNA vaccines: designing strategies against parasitic infections." Genet Vaccines Ther **2**(1): 17.
- Jondal, M., R. Schirmbeck, et al. (1996). "MHC class I-restricted CTL responses to exogenous antigens." Immunity **5**(4): 295-302.
- Jones, T., A. Stern, et al. (1994). "Potential role of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor as vaccine adjuvant." Eur J Clin Microbiol Infect Dis **13 Suppl 2**: S47-53.
- Julander, J. G., J. W. Judge, et al. (2007). "Prophylactic treatment with recombinant Eimeria protein, alone or in combination with an agonist cocktail, protects mice from Banzi virus infection." Antiviral Res **75**(1): 14-9.
- Khaznadji, E., C. Boulard, et al. (2003). "Expression of functional hypodermin A, a serine protease from Hypoderma lineatum (Diptera, Oestridae), in Schneider 2 cells." Exp Parasitol **104**(1-2): 33-9.

- Kim, J. J., J. S. Yang, et al. (2000). "Macrophage colony-stimulating factor can modulate immune responses and attract dendritic cells in vivo." Hum Gene Ther **11**(2): 305-21.
- Kim, L., B. A. Butcher, et al. (2006). "Toxoplasma gondii genotype determines MyD88-dependent signaling in infected macrophages." J Immunol **177**(4): 2584-91.
- Kowalczyk, D. W. and H. C. Ertl (1999). "Immune responses to DNA vaccines." Cell Mol Life Sci **55**(5): 751-70.
- Lewis, P. J., H. van Drunen Littel-van den, et al. (1999). "Altering the cellular location of an antigen expressed by a DNA-based vaccine modulates the immune response." J Virol **73**(12): 10214-23.
- Mevelec, M. N., D. Bout, et al. (2005). "Evaluation of protective effect of DNA vaccination with genes encoding antigens GRA4 and SAG1 associated with GM-CSF plasmid, against acute, chronical and congenital toxoplasmosis in mice." Vaccine **23**(36): 4489-99.
- Montoya, J. G. and O. Liesenfeld (2004). "Toxoplasmosis." Lancet **363**(9425): 1965-76.
Pepper, M., F. Dzierszinski, et al. (2008). "Plasmacytoid dendritic cells are activated by Toxoplasma gondii to present antigen and produce cytokines." J Immunol **180**(9): 6229-36.
- Pertmer, T. M., T. R. Roberts, et al. (1996). "Influenza virus nucleoprotein-specific immunoglobulin G subclass and cytokine responses elicited by DNA vaccination are dependent on the route of vector DNA delivery." J Virol **70**(9): 6119-25.
- Plattner, F., F. Yarovinsky, et al. (2008). "Toxoplasma profilin is essential for host cell invasion and TLR11-dependent induction of an interleukin-12 response." Cell Host Microbe **3**(2): 77-87.
- Rosenberg, B., D. A. Juckett, et al. (2005). "Protein from intestinal Eimeria protozoan stimulates IL-12 release from dendritic cells, exhibits antitumor properties in vivo and is correlated with low intestinal tumorigenicity." Int J Cancer **114**(5): 756-65.
- Rush, C., T. Mitchell, et al. (2002). "Efficient priming of CD4+ and CD8+ T cells by DNA vaccination depends on appropriate targeting of sufficient levels of immunologically relevant antigen to appropriate processing pathways." J Immunol **169**(9): 4951-60.
- Sahoo, N., W. Beatty, et al. (2006). "Unusual kinetic and structural properties control rapid assembly and turnover of actin in the parasite Toxoplasma gondii." Mol Biol Cell **17**(2): 895-906.

- Scanga, C. A., J. Aliberti, et al. (2002). "Cutting edge: MyD88 is required for resistance to Toxoplasma gondii infection and regulates parasite-induced IL-12 production by dendritic cells." J Immunol **168**(12): 5997-6001.
- Sharma, S. D., J. Mullenax, et al. (1983). "Western Blot analysis of the antigens of Toxoplasma gondii recognized by human IgM and IgG antibodies." J Immunol **131**(2): 977-83.
- Strasser, J. E., R. L. Arnold, et al. (2000). "Herpes simplex virus DNA vaccine efficacy: effect of glycoprotein D plasmid constructs." J Infect Dis **182**(5): 1304-10.
- Suzuki, Y., M. A. Orellana, et al. (1993). "Susceptibility to chronic infection with Toxoplasma gondii does not correlate with susceptibility to acute infection in mice." Infect Immun **61**(6): 2284-8.
- Svanholm, C., B. Lowenadler, et al. (1997). "Amplification of T-cell and antibody responses in DNA-based immunization with HIV-1 Nef by co-injection with a GM-CSF expression vector." Scand J Immunol **46**(3): 298-303.
- Warren, T. L. and G. J. Weiner (2000). "Uses of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in vaccine development." Curr Opin Hematol **7**(3): 168-73.
- Xiang, Z. and H. C. Ertl (1995). "Manipulation of the immune response to a plasmid-encoded viral antigen by coinoculation with plasmids expressing cytokines." Immunity **2**(2): 129-35.
- Yap, G. S. and A. Sher (1999). "Cell-mediated immunity to Toxoplasma gondii: initiation, regulation and effector function." Immunobiology **201**(2): 240-7.
- Yarovinsky, F., H. Kanzler, et al. (2006). "Toll-like receptor recognition regulates immunodominance in an antimicrobial CD4+ T cell response." Immunity **25**(4): 655-64.
- Yarovinsky, F. and A. Sher (2006). "Toll-like receptor recognition of Toxoplasma gondii." Int J Parasitol **36**(3): 255-9.
- Yarovinsky, F., D. Zhang, et al. (2005). "TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein." Science **308**(5728): 1626-9.

Article 3

Mise en place d'une immunité protectrice contre l'infection au *Toxoplasme* chez la souris suite à l'immunisation avec l'antigène du *Toxoplasme* combiné à la profiline like d'*Eimeria* comme adjuvant.

Introduction

Les profilines de *T. gondii* et *d'Eimeria tenella* ont la capacité d'induire la synthèse d'IL-12 par les cellules dendritiques, plus particulièrement les cellules dendritiques conventionelles (CD8α+) et les celllules dendritiques plasmacytoïdes (Yarovinski et al, 2005 ; Pepper, Dzierszinski et al., 2008). Cette sécrétion nécessite une liaison via le TLR11 et passe par la voie de transcription MyD88. L'effet adjuvant de la profiline d'*E. tenella* a été démontré à la fois dans une stratégie de thérapie cancéreuse et contre des infections virales (Rosenberg *et al*., Int. J. Cancer, 2005; Gowen *et al*., Antimicrob. Agents Chemother., 2006; Julander *et al*., Antiviral Res., 2007). L'étude de la profiline en tant qu'adjuvant a été réalisée avec la profiline *d'E. tenella* en collaboration avec Judge JW (Barros Research Institute, Holt, MI, USA). Une protéine recombinante de la profiline d'*E. tenella* (rEA) a été produite en système procaryote et purifiée par différentes étapes de chromatographie (Rosenberg *et al*., Int. J. cancer, 2005). L'immunisation par voie intra-péritonéale de souris CBA/J avec de l'extrait parasitaire de *T. gondii* associé à la protéine rEA a entraîné une augmentation significative de la réponse humorale dirigée contre les protéines de *T. gondii* et une augmentation significative de la réponse cellulaire de type Th1, caractérisée par une synthèse accrue, après stimulation des splénocytes *in vitro,* d'IL-2 et d'IFN-γ. Les souris ont été infectées par voie orale avec 70 kystes de la souche 76K (souche de type II) et la protection a été évaluée par le dénombrement des kystes cérébraux au cours de la phase chronique de l'infection soit un mois après l'épreuve. Les réponses immunitaires amplifiées par la protéine rEA ont conduit à une protection significative corrélée à une baisse de la charge parasitaire cérébrale de 62% par rapport aux souris témoins non immunisées alors qu'une réduction de 36% est observée chez les souris immunisées avec l'extrait parasitaire de *T. gondii* sans rEA. Suite à ces résultats, des essais de vaccination par voie muqueuse ont été réalisés. En effet *T. gondii* est un parasite, qui infecte habituellement l'hôte par voie intestinale ce qui justifie une approche vaccinale par voie muqueuse. De bonnes protections ont été obtenues dans des

essais de vaccination par voie orale (Bourguin *et al*., Infect. Immun., 1993) ou nasale (Debard *et al*., Infect. Immun., 1996 ; Bonenfant *et al*., Infect. Immun., 2001), capables d'induire des réponses immunes locale et systémique afin d'atteindre le parasite dès sa pénétration. Ces immunisations ont utilisé la toxine cholérique ou des entéro-toxines thermosensibles mutées, adjuvants sélectifs de l'immunité des muqueuses, associées à de l'extrait parasitaire ou à une protéine SAG1 immunopurifiée. L'immunisation par voie nasale (la voie nasale a été préférée à la voie orale car elle évite la destruction des antigènes par les sucs digestifs de l'estomac) de souris avec de l'extrait parasitaire de *T. gondii* associé à la protéine rEA a conduit à une augmentation de la réponse humorale en terme de nombre de souris séropositives par rapport aux souris immunisées avec l'extrait parasitaire seul. Une synthèse spécifique d'IL-2 après stimulation *in vitro* des splénocytes issus des souris immunisées avec l'extrait parasitaire de *T. gondii* associé à la protéine rEA a été observé, sans modification de la synthèse d'IFN-γ, par rapport aux souris immunisées avec l'extrait parasitaire seul. Une protection significative contre la phase chronique de l'infection est observée chez les souris immunisées avec l'extrait parasitaire associé à la protéine rEA (réduction de la charge parasitaire de 50 % par rapport aux témoins) alors que les souris immunisées avec l'extrait seul ne sont pas protégées.

La capacité à augmenter les réponses immnunes anti-*T. gondii* de la protéine rEA est moindre par voie nasale mais conduit néanmoins à une protection significative. L'effet adjuvant de la protéine rEA pourrait être augmenté par une vectorisation visant à protéger les protéines de la dégradation dans le milieu extra-celllulaire et à faciliter le passage à travers la barrière épithéliale.

Dans nos conditions expérimentales, les réponse immunes humorale et cellulaire dirigées contre la protéine rEA sont spécifiques de la protéine bien que cette protéine présente 67% d'homologie avec la profiline de *T. gondii*. Les IgG sériques des souris immunisées avec la protéine rEA seule ne réagissent pas avec la profiline de *T. gondii* et leur splénocytes ne produisent pas de cytokines *in vitro* après stimulation avec l'extrait parasitaire de *T. gondii*. La capacité de la protéine rEA à augmenter les réponses immunes et la protection repose uniquement sur ses propriétés adjuvantes.

Protective immunity against *Toxoplasma* challenge in mice by coadministration of *T. gondii* antigens and *Eimeria* profilin-like protein as an adjuvant.

Dorsaf Hedhli [1], Isabelle Dimier-Poisson [1], John W. Judge [2], Barnett Rosenberg [2], Marie Noëlle Mévélec [1*].

(1) UMR 483 Université-INRA d'Immunologie Parasitaire, Vaccinologie et Biothérapie anti-infectieuse, UFR des Sciences Pharmaceutiques,37200 Tours ; IFR136 Agents Transmissibles et Infectiologie, INRA, Nouzilly, Tours, France.

(2) Barros Research Institute, 2430 College Road, Holt, Michigan, 48842, USA.

* Corresponding author:

Dr. Marie Noëlle Mévélec, UMR Université-INRA d'Immunologie Parasitaire, Vaccinologie et Biothérapie anti-infectieuse, UFR des Sciences Pharmaceutiques, 37200, Tours, France Tel :+33 2 47 36 71 86, Fax : +33 2 47 36 72 52, e-mail : mevelec@univ-tours.fr

Abstract

Toll-like receptor (TLR) ligands are attractive adjuvant candidates in vaccine development. *Eimeria tenella* profilin-like protein has recently been shown to be a potent agonist of the innate immune system through its recognition by Toll-like receptor-11. In this report, we studied the systemic and mucosal adjuvant activity of *Eimeria* profilin-like protein within a vaccinal strategy against *Toxoplasma gondii* in mice. Using intraperitoneal (i.p) immunization, we observed that coadministration of the recombinant *Eimeria* antigen (rEA) with *Toxoplasma gondii* antigen (TAg) effectively elevates plasma levels of IL-12p70 and IFN-γ and consequently induced both enhanced specific humoral and Th1 cellular immune responses. The co-administration of TAg plus rEA by i.p route signifcantly enhanced the protection against *T. gondii* infection (62% brain cyst reduction) in comparison with control mice and with mice immunized with TAg alone (only 36% brain cyst reduction). After intranasal immunization, humoral and cellular responses were weak. However mice immunized nasally with TAg plus rEA were significantly protected with 50% of brain cyst reduction, conversely TAg immunized mice did not present any brain cyst reduction.

These results indicate that *Eimeria* profilin-like protein would serve as an efficacious systemic and mucosal adjuvant inducing protective immune response against chronical stage of *T.gondii* infection through TLR11 activation.

Keywords: *Toxoplasma gondii*; *Eimeria* profilin-like protein; protection.

1. Introduction

Toxoplasma gondii is the most prevalent protozoan parasite on earth, affecting a wide range of warm blooded vertebrates. In animals, toxoplasmosis is of great economic impact as it causes abortions, still births and neonatal loss in all types of live stock (Buxton 1998; Montoya and Remington 2008). The life cycle of the parasite in mice closely resembles that in humans. After oral ingestion *T.gondii* crosses the intestinal epithelium, disseminates in the deep tissues, and traverses biological barriers to reach sites where it causes severe pathology (Barragan and Sibley 2002). Thus *T.gondii* infection in mice has become a major model to elucidate the basis of protective immunity against intracellular pathogen in general and to examine the regulation of immunopathologic changes elicited by such infectious agents. The knowledge acquired from these studies has provided new insights into designing more effective vaccines.

The following immune mechanisms are triggered following toxoplasma infection: dendritic cells, neutrophils and macrophages secrete interleukin IL-12 during infection (Gazzinelli, Hieny et al. 1993; Reis e Sousa, Hieny et al. 1997; Bliss, Butcher et al. 2000; Pepper, Dzierszinski et al. 2008). IL-12 activates T cells and NK cells to produce IFN-γ, the major mediator of host resistance during the acute and chronic phases of infection (Yap and Sher 1999). Interleukin-12 is the major cytokine triggering IFN-γ synthesis and IL12 -/- deficient mice succumb to acute toxoplasmosis (Scanga, Aliberti et al. 2002; Kim, Butcher et al. 2006). Because of the central role of IL-12 in acute resistance to *T.gondii* and other microbial pathogens (Liu, Fan et al. 2006; Jakobi and Petry 2008), considerable interest is focused on signaling pathways involved in induction of this cytokine during infection. MyD88, an essential adaptator molecule in TLR-initiated signalling, is a critical step in the initiation of the IL-12 dependant response to *T.gondii*. It was found that *T. gondii* infection in MyD88 -/- deficient mice resulted in severely reduced IL-12 levels (Scanga, Aliberti et al. 2002; Kim, Butcher et al. 2006). TLR-MyD88 signaling is important, not only in innate immune response, but also in initiation of acquired immunity (Kabelitz and Medzhitov 2007) and IL-12 is a key cytokine that links innate and adaptative immune system. Thus agonists that activate TLR-MyD88 signaling pathways will be useful as vaccine adjuvants by promoting both innate and adaptative immune responses. Yet clinical development activity has centered on TLR agonists as vaccine adjuvants (Pulendran and Ahmed 2006).

Recently, a recombinant antigen of *Eimeria* (rEA), a profiling-like protein, which was described as a potent stimulator of IL-12 release from dendritic cells, upregulates

inflammatory modulators *in vivo* (IL-12, MCP-1, IL-6, TNF-α, INF-γ) and has antitumor properties in mice (Rosenberg, Juckett et al. 2005). The same protein (rEA) shows antiviral properties, eliciting a resistance to acute phlebovirus infection in C57BL/6 mice (Gowen, Smee et al. 2006). Treatment with rEA, alone or in combination with agonist cocktail, is efficacious for the prophylaxis of Banzi virus infection in mice (Julander, Judge et al. 2007). rEA failed to elicit IL-12 and IFN-γ in mice lacking MyD88 adaptator, suggesting that MyD88 is crucial to the immunostimularory activity induced by rEA in mice and that a member of the TLR family of receptors is involved, presumably TLR11. Indeed, TLR-11 was found to be implicated in IL-12 secretion by MyD88 +/+ dendritic cells when it recognized a profilin-like protein of *Toxoplasma gondii* (Yarovinsky, Zhang et al. 2005), a protein which has limited homology to rEA (67%). The properties of rEA as an inducer of protozoan-targeted innate immunity led us to use it as an adjuvant in the framework of vaccinal strategy against *T.gondii.* In fact adjuvants play an important role in the efficacy of vaccines. In addition to increasing the strength and kinetics of an immune response, they also play a role in determining the type of immune response generated (Fraser, Diener et al. 2007). In this context our work consist on the characterization of some immunological mechanisms involved in host resistance to infection after immunization per intraperitoneal route (i.p) with *Toxoplasma gondii* RH *T. gondii* antigen (TAg) co-delivered with recombinant antigen of *Eimeria* (rEA) as an innate immunity adjuvant in a murin model against the chronical stage of toxoplasmosis. This protein has been succefully used for prophylactic and therapeutic treatments per intraperitoneal route (i.p). However, because the natural site of infection for *T.gondii* is the mucosal surface of the intestine, the protective immunity obtained after natural infection with *T.gondii* points to the importance of developing a vaccine that stimulates mucosal defences (Kasper, Courret et al. 2004; Buzoni-Gatel, Schulthess et al. 2006). Futhermore, infection with *T. gondii* generally occurs via the oral route and triggers cellular and humoral responses in the gut (Chardes, Velge-Roussel et al. 1993). Therefore, mucosal immune responses function as a first line of defence, especially at the intestinal site. Since all mucosal surfaces have the same mucosal immune system, the immune response following intranasal administration can provide protection at the administration site and at various effector sites as part of the common mucosal immune system (Kraehenbuhl and Neutra 1992; Davis 2001). Previous observations from our laboratory have demonstrated the importance of the mucosal immunization in the development of strong immune response against *T.gondii* (Bourguin, Chardes et al. 1993;

Velge-Roussel, Marcelo et al. 2000; Bonenfant, Dimier-Poisson et al. 2001). So our aim was to use rEA as an adjuvant for immunization against *T.gondii* by intraperitonal and nasal routes.

2. Materials and methods

2.1. Mice

Seven to eight-week old female inbred mice CBA/J (H-2^k) were purchased from Janvier, France and maintained in a pathogen free environment. Experiments were performed in accordance with the rules of the Ethic Committee at Tours University and with the statement for use of animals in vaccination research.

2.2. Parasites

Tachyzoites of the RH strain were acquired after culture in 75 cm^2 plastic flasks containing human foreskin fibroblastes (HFF) incubated at 37°C under 5% CO_2. Cysts of the 76k strain of *T.gondii* were maintained in the laboratory by passage of infective brain homogenate in CBA/J mice, and used for all experimental infections.

2.3. Preparation of *Toxoplasma gondii* antigen (TAg).

TAg was obtained from RH strain of *T. gondii*. Tachyzoites in Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS) were sonicated (80 w, 20 min) and centrifuged (3000 rpm, 20 min). The supernatant, which was used as the source of antigen, was recovered and stored in aliquots at -20°C. The concentration was determined by a protein assay reagent kit (Bio-Rad) with bovine serum albumin as the standard.

2.4. rEA expression and purification.

rEA was produced by previously described methods (Rosenberg, Juckett et al. 2005). In brief, cDNA was isolated from *Eimeria tenella* using appropriate primers and was used to transform an *Escherchia coli* bacterium for protein expression. Following protein induction, the bacteria were harvested, pelleted, and disrupted with a French press. The protein was isolated from the cellular debris by two ammonium sulfate precipitation steps, and three chromatographic steps (gradient hydrophobic interaction chromatography, gradient anion-exchange chromatography, and size-exclusion chromatography). Approximately 20mg of pure protein was obtained from 1 litre of cell culture, with purity

typically being >98% as assayed by C_8 reversed-phase high-pressure liquid chromatography and mass spectrometry. The rEA was used at 1µg/mouse/treatment.

2.5. Immunization of animals

For intraperitoneal injections, three groups of 11 mice were immunized three times at 2 weeks intervals with: TAg (15µg/mouse), rEA (1µg/mouse), TAg (15 µg/mouse) mixed with rEA (1µg/mouse). Untreated mice were considered as the control group. All antigens are dissolved in Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS). Sera from 5 to 6 animals per group were obtained 2 weeks after the last immunization for determination of anti-*T.gondii* antibody. Three weeks after the last immunization, 3 animals per group were euthanasied, their spleen were removed for cytokine assays.

Three groups of 11 mice were immunized intranasally three times at 2 weeks intervals with: TAg (15µg/mouse), rEA (1µg/mouse), TAg (15µg/mouse) mixed with rEA (1µg/mouse). Non immunized mice constitute the control group. Each dose of immunogen was instilled into the nostrils of mice with a micropipettor (13µl/mice). Sera from 4 to 6 animals per group were obtained 2 weeks after the last immunization for determination of anti-*T.gondii* antibody. Three weeks after the last immunization, 3 animals per group were euthanized and their spleen and mesenteric lymph nodes removed for cytokine assays.

2.6. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for IgG and IgA determination

Level of antigen-specific IgG antibodies in serum samples were determined by standard procedures. Briefly, the 96 flat-bottom wells of microtiter plates (Maxisorp; Nunc, Roskilde, Danemark) were coated overnight at 4°C with TAg at 15µg/ml in PBS. After three washes in PBS containing 0.05% Tween (PBS-0.05% tween 20), nonspecific binding sites were blocked with 4% bovine serum albumin (PBS-4% BSA) for 1h at 37°C. Twofold serial dilutions of serum samples from mice immunized by the intraperitoneal route or serum samples from mice immunized by the nasal route diluted to 1:10 in PBS were added to the wells and incubated for 1.5 hours at 37°C. After three washes in PBS-Tween 20, bound antibodies were detected by incubation for 1.5 hours at 37°C with a goat anti-mouse IgG-alkaline phopsphate conjugate (Sigma) diluted to 1:5000 in PBS 4%-BSA. After the plates were washed in PBS-Tween 20, the bound phosphatase activity was measured with p-nitrophenylphosphate at 1mg/ml in 1M diethanolamine buffer (pH 9.8). After incubation for 30 min at room temperature, the

OD_{405} of each sample was read in a Wallac Victor 2 counter plate reader (Perkin Elmer-France).

Level of antigen-specific IgA antibodies in serum or in intestinal washes were detected by a goat anti-mouse IgA-peroxydase conjugate diluted to 1:1000. The bound peroxydase activity was measured with tetramethylbenzidine (TMB) (Sigma-Aldrich-France). After incubation for 1h at 37°C; OD_{450} of each sample was read in Wallac ELISA reader.

2.7. Determination of the anti-*T. gondii* IgG subclass

The anti-TAg IgG subclass was determined by ELISA as described above, except that sera were added to the plates at a single dilution (1:1600 for sera of mice immunized with TAg and 1:3200 for sera of mice immunized with TAg combined with rEA). The alkaline phosphatase-conjugated anti-mouse IgG1, IgG2a (Sigma, Germany) were used at 1:1000 in PBS-4%BSA. The results are expressed as mean $OD_{405} \pm$ SD.

2.8. Western blotting

The pellet of $2x10^8$ purified *T.gondii* tachyzoîtes (RH strain) was suspended in sodium dodecyl sulfate-polyachrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) sample buffer (without reducing agent), sonicated, heated, at 100°C for 5min. and separated on a 10% polyacrylamide gel. After electrophoresis, proteins were transferred onto a nitrocellulose membrane, which was probed with one of the following: monoclonal antibody 3G11 (anti-SAG2), 1E5 (anti-SAG1), 1F12 (anti-SAG3), T42F3 (anti-MIC3) diluted 1:100 in 5% nonfat dried milk-TNT (15mM Tris HCl, 140 mM NaCl, 0,05% Tween 20) as previously described (Chardes, Bourguin et al. 1990) , serum of immunized mice diluted 1:50 in 5% nonfat dried milk-TNT. Bound antibodies were detected using anti-mouse immunoglobulin G (IgG) alkaline phosphatase conjugate (Sigma) diluted 1:5000 in 5% nonfat dried milk-TNT. Alkaline phosphatase activity was detected using the 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phophate/nitroblue tetrazolium (BCIP/NBT) liquid substrat system (Sigma-Aldrich; France). Specific anti-*T. gondii* IgA were determined in intestinal washes using the same protocol except that bound antibodies were detected with anti-mouse immunoglobulin A (IgA) alkaline phosphatase conjugate (Sigma-Aldrich; France) which is diluted 1:1000 in 5% nonfat dried milk-TNT. Molecular mass standards (prestained SDS-PAGE standards, low range; Bio-Rad) were used. The monoclonal antibodies were generously donated by J.-F. Dubremetz (Centre National de la Recherche Scientifique, Montpellier, France)

2.9. Cytokine assays

Mouse serum samples, supernatants of splenocytes culture samples and mesenteric lymph node cell culture samples were analysed for multiple cytokine levels (IL-12p70, IL-2, IFN- γ, IL-10, IL-4). Mouse plasma was collected 7 hours after intraperitoneal administration of 1µg per mouse of rEA combined or not with 15µg of TAg per mouse and assayed for IL-12p70, IFN-γ and IL-10 production. Spleen and mesenteriques lymph nodes stimulation were assayed as described previously (Ismael, Sekkai et al. 2003). Cells were stimulated by being incubated with 10µg of TAg per ml or with 2µg of rEA per ml or with 10µg per ml of concanavalin as positive control or with medium alone. Cell-free supernatants were harvested and assayed for interleukine-4 (IL-4) activity at 24h, IL-2 activity at 48h, IL-10 activity at 72h and gamma interferon (IFN-γ) activity at 96h. The concentrations of all cytokines were determined with ELISA kit (OptEIA set; Pharmingen, San Diego, Calif.) as specified by the manufacturer. The sensitivity limits for the assays were 30 pg/ml for IL-12, 10 pg/ml for IL-2 and IL-4, 20 pg/ml for IFN-γ, and 50 pg/ml for IL-10.

2.10. Challenge infection

CBA/J mice were infected orally with 70 cysts of the 76K strain 3 weeks after the last immunization. One month after the challenge, mice were sacrified and their brains were removed. Each brain was homogenized in 5 ml of RPMI medium with a pestle and mortar. The mean number of cysts per brain was determined microscopically by counting eight samples (10µl each) of each homogenate. The results are expressed as means ± SD for each group.

2.11. Statistical analysis

Levels of significance of the differences between groups of mice were determined by Mann-Whitney test for the protection studies and with Student's test for the other analyses using GraphPad Instat 2.1 software.

3. Results

3.1 Evaluation of the humoral immune response after intraperitonal immunization

Immunoblot analysis showed that all tested sera from mice immunized three times by intraperitoneal route with TAg alone or with TAg+rEA contain IgG antibodies directed against *T. gondii* antigens with apparent molecular masses of 22, 30, 43, 45 and 60 kDa (Fig.1). The intensity of the bands was enhanced when the sera were derived from mice immunized with TAg+rEA, in comparison to those from mice immunized with TAg alone. Antigens of apparent molecular masses of 22, 30 and 43 kDa, recognized by anti-*T.gondii* IgG antibodies showed a migration pattern similar to that of SAG2, SAG1 and SAG3 as detected by specific monoclonal antibodies. All these bands were not detected by IgG antibodies from mice injected with rEA and untreated mice. To determine the levels of antibody titers, all sera were tested by ELISA using TAg (Fig.2). After the third immunization, the IgG antibody titer was significantly greater in sera of mice coimmunized with TAg and rEA (12±1.3) than in the sera of mice immunized with TAg alone (8.4±1.3) (P=0.002). In contrast rEA injected mice or untreated mice did not generate antibody against TAg. In conclusion, intraperitonal immunization with TAg combined with rEA induced specific and higher serum anti-IgG response then immunization with TAg alone.

Figure 1: **Vaccine, Hedhli et *al***

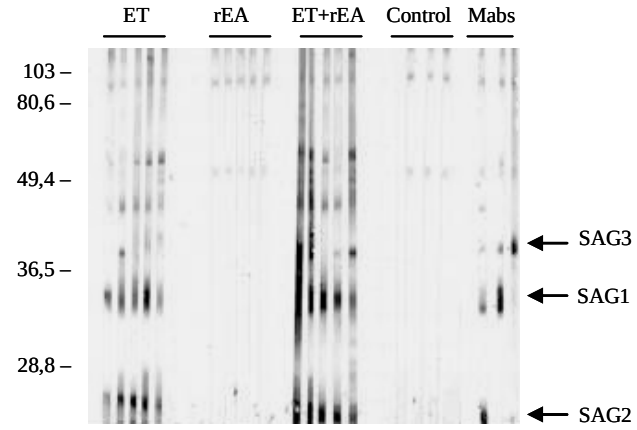


Fig. 1. Immunoblot analysis of humoral response (IgG) at day 35 following the third intraperitoneal immunization of CBA/J mice with TAg alone or combined with rEA. A *T. gondii* lysate was electrophoresed in a 10% SDS-polyachrylamide gel under non-reducing conditions, transferred to nitrocellulose and probed with sera from mice immunized with TAg alone, rEA alone, TAg combined with rEA or control mice. Sera were diluted at 1/50. The following monoclonal antibodies were used (in order): 3G11 (anti-SAG2), 1E5 (anti-SAG1), 1F12 (anti-SAG3). The results are representative data of two experiments.

Figure 2

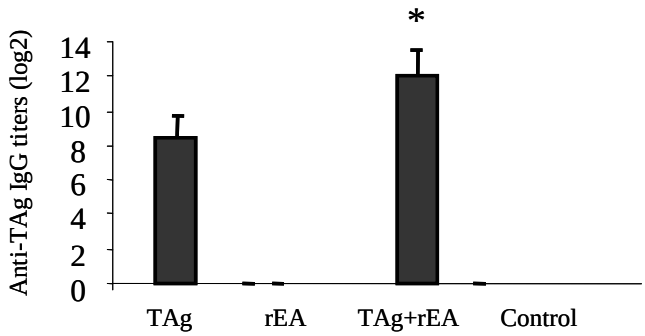


Fig. 2. Determination of specific anti-*T.gondii* antibody titers in the sera of mic immunized with 15µg of TAg alone or combined with 1µg of rEA on days 0, 14 and 28 by the intraperitoneal route. Sera were collected on day 35 and tested by ELISA using TAg. The titer is given as the reciprocal of the highest dilution with an OD_{405} that was 2.5-fold greater than the OD of untreated mouse sera at the same dilution. Results are expressed as the mean log2 titers and SD and are representative of two experiments. Significant differences TAg vs TAg+rEA are designated as *P=0.002.

3.2 Cytokine production in serum and supernatants of splenocytes culture after intaperitoneal immunization.

Mouse serum samples were assayed for IL-12p70, IFN-γ and IL-10 production. High serum IL-12p70 level (263±30 ng/ml for rEA immunized mice and 232±31 ng/ml for TAg+rEA immunized mice) and INF-γ level (1651±298 for rEA immunized mice pg/ml and 3218±754 pg/ml for rEA immunized mice) were observed in mice seven hours following the first immunization by intraperitoneal route with rEA with or without TAg (Table 1). Sera of mice immunized with TAg alone did not show any specific IL-12p70 or IFN-γ production. No IL-10 production was detected in serum of any group. These results indicate that immunization with rEA rapidly and effectively elevates plasma levels of IL-12p70 and IFN-γ. (P<0.001, for both IL-12p70 and IFN-γ productions, TAg+rEA versus control group and rEA versus control group). The supernatants of splenocytes culture from mice immunized three times with TAg alone, rEA alone or TAg combined with rEA were harvested at different times after restimulation with TAg or rEA and assessed for the production of IL-2, IFN-γ, IL-10 and IL-4 (Table 2). When stimulated with TAg (Table 2A), specific amounts of IL-2 and IFN-γ (P=0.002, TAg+rEA versu control) were produced in the supernatants of restimulated splenocyte cultures from mice immunized with TAg combined with rEA. IL-2 was not detected and non-specific production of IFN-γ was observed in the supernatants of splenocytes from mice immunized with TAg alone or rEA alone. In contrast, no specific release of IL-10 from any culture supernatant was detectable. After splenocytes stimulation with rEA (Table 2B), specific productions of IL-2, IFN-γ and IL-10 were detected in splenocyte supernatants of mice immunized with rEA (combined or not with TAg). Splenocyte of mice immunized with TAg and stimulated with rEA did not present significant IL-2, IFN-γ or IL-10 productions compared to control mice. This observation lead us to conclude that there is no cross reaction between rEA and toxoplasma antigens. IL-4 was not detected in splenocyte supernatants in any group regardless of the antigen of stimulation.

rEA upregulates pro-inflammatory cytokines and has no effect on IL-10 and IL-4 production when given by the intraperitoneal route. It seems to direct anti-*T.gondii* response toward a Th1 response.

Cytokine productions in serum of immunized CBA/J mice, 7 hours after the first immunization by intraperitoneal route with TAg alone, rEA alone or TAg combined with rEA.

	Cytokine production (mean ±SD)		
Group[a]	IL-12 (ng/ml)	IFN-γ (pg/ml)	IL-10 (pg/ml)
TAg	nd	nd	nd
rEA	263±30*	1651±298*	nd
TAg+rEA	232±31*	3218±754*	nd
Control	30±10	89±154	nd

[a] mice were immunized with 15µg of TAg alone or combined with 1µg of rEA

nd: not detected.

The results are representative data of two experiments.

Significant differences with control group were designated as *P<0.001

Cellular response of splenocytes from CBA/J mice immunized by the intraperitoneal route with TAg alone, rEA alone or TAg combined with rEA, after stimulation by TAg (A) or rEA (B).

A.

Group[a]	Cytokine production (mean ± SD) IL-2 (pg/ml)	IFN-γ (pg/ml)	IL-10 (pg/ml)	IL-4 (pg/ml)
TAg	nd	707±678*	1860±847	nd
rEA	nd	310±500	1252±235	nd
TAg+rEA	15±7	3684±538**	1619±240	nd
Control	nd	261±369	1229±730	nd

B.

Group[a]	Cytokine production (mean ± SD) IL-2 (pg/ml)	IFN-γ (ng/ml)	IL-10 (pg/ml)	IL-4 (pg/ml)
TAg	nd	0.569±0.5	158±67	nd
rEA	29±19	27.47±12.05	2330±1602	nd
TAg+rEA	46±14	34.97±6.84	3188±917	nd
Control	nd	nd	91,6±94,2	nd

[a] Mice were immunized with 15µg of TAg alone or combined with 1µg of rEA on days 0, 14 and 28 by the intraperitoneal route. Splenocytes were recovered 3 weeks after the last immunization and cultured with 10 µg/ml TAg (A) or 2µg/ml rEA (B); nd: not detected

Diffrence TAg vs TAg+rEA is designated as *P =0.007

Significant differences with control group were designated as **P=0.002

The results are representative data of two experiments.

3.3 Specific anti-*T. gondii* IgG subclass induced after immunization by intraperitoneal route

We were also interested in finding whether a Th1 and/or Th2 humoral response to *T. gondii* was generated by TAg combined with rEA immunization. Therefore we analysed the distribution of IgG subtypes IgG1 and IgG2a directed against TAg (Fig.3). Both IgG1 and IgG2a were found in the sera of mice immunized with TAg alone or with rEA. On its one, TAg gave a Th2 response (IgG2a/IgG1 ratio<1); however, with rEA adjuvant the *T.gondii* specific response was predominantly Th1 (IgG2a/IgG1 ratio>1). This result indicates that rEA is able to overcome the Th1/Th2-bias of the antigen (IgG2a>> IgG1). These findings confirm the results obtained with the cytokine investigation indicating that rEA is able to direct anti-*T.gondii* immune reponse toward Th1 response when administrated by intraperitoneal route.

Fig 3: **Vaccine, Hedhli et *al***

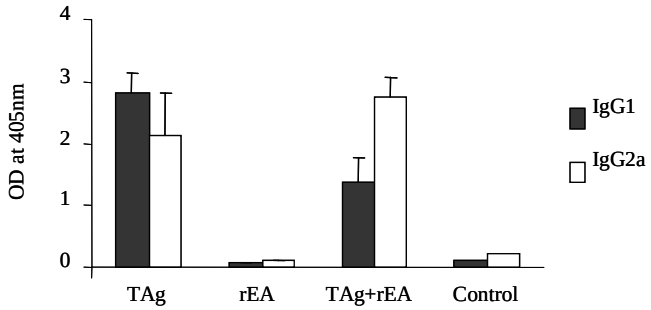


Fig. 3. Determination of specific anti-*T.gondii* IgG subclass profile in the sera of CBA/J mice immunized with 15µg of TAg alone or combined with 1µg of rEA on days 0, 14 and 28, by the intraperitoneal route. Sera were collected on day 35 and analysed by ELISA using TAg. Results are expressed as the mean of the OD_{405} ± SD and are representative of two experiments.

3.4 Effective protection of vaccination with rEA used as adjuvant by intraperitoneal route

To test whether immunization with TAg combined with rEA induced effective protection against *T.gondii* infection, the immunized mice were orally challenged with 70 cysts of *T.gondii* 76K 3 weeks after the last immunization. One month after the oral challenge, the cysts in the brains of mice were counted (Fig.4). After intraperitoneal immunization, significant protection was obtained in the mice immunized with TAg alone, which had 36% fewer brain cysts than did non immunized mice (2603±770 cysts versus 2603±770 cysts). Coadministration of rEA potentiated the protection. Mice immunized with TAg plus rEA had significantly fewer brain cysts (1531±375 cysts, 62% reduction) than non immunized control mice (P<0.001) and significant brain cysts reduction (41%) compared to mice immunized with TAg alone (P=0,009). No protection was observed in mice immunized with rEA alone. These results demonstrated the protective effect of TAg combined with rEA as an adjuvant when used by intraperitoneally route against *T.gondii* infection.

Fig 4: **Vaccine, Hedhli et *al***

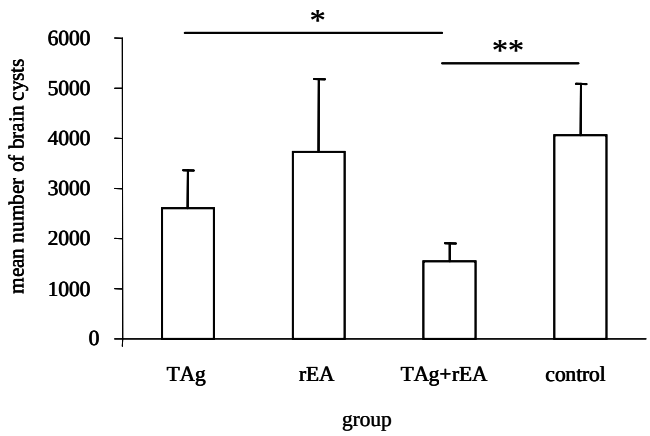


Fig. 4. Brain cyst load of CBA/J mice immunized by the intraperitoneal route with 15µg of TAg alone or combined with 1µg of rEA on days 0, 14 and 28. Control mice were left untreated. Three weeks after the last immunization, the mice were orally infected with 70 cysts of 76K *T. gondii* strain. Brain cyst load was evaluated 1 month after challenge. Vaccination with TAg plus rEA significantly reduced the formation of brain cyst compared to control mice (**p<0.001) and TAg immunized mice (*p<0.01)

Results from one of two similar experiments are shown.

3.5 Evaluation of humoral immune response after nasal immunization

Sera and intestinal washes from mice immunized by the nasal route were collected prior to challenge. Anti-*T. gondii* IgA was investigated in intestinal washes by ELISA (Fig.5) and immunoblot (Fig.6) versus TAg. Sera were analysed by ELISA to detect anti *T.gondii*-IgA and IgG antibodies (Table 3). In intestinal washes, anti-*T.gondii* IgA antibodies were detected by ELISA in one of six mice immunized with TAg combined with rEA. Anti-*T. gondii* IgA was not detected in mice immunized with TAg alone. Immunoblot analysis of intestinal washes confirmed ELISA results. The intestinal anti-*T.gondii* IgA antibodies from the mouse immunized with TAg plus rEA, positive by ELISA, detected an antigen with apparent molecular mass of 30kDa which showed a migration pattern similar to that of SAG1 as detected by specific monoclonal antibodies (Fig.6). In contrast, immunoblot failed to detect anti-*T. gondii* IgA antibodies in intestinal washes from mice immunized with TAg. In sera, anti-*T.gondii* IgA antibodies were detected only in one of twelve mice immunized with TAg alone (Table 3). However, anti-*T.gondii* IgA antibodies were detected in five of twelve mice immunized with TAg combined with rEA Similar results were obtained with anti-*T.gondii* IgG antibodies.

Anti-*T.gondii* IgG antibodies were detected in only two of twelve (16.7%) mice immunized with TAg alone whereas the number of positive mice increased to seven of twelve (58%) when mice were immunized with TAg plus rEA. These results indicate that rEA is able to enhance the humoral response after immunization by nasal route.

Fig 5: **Vaccine, Hedhli et *al***

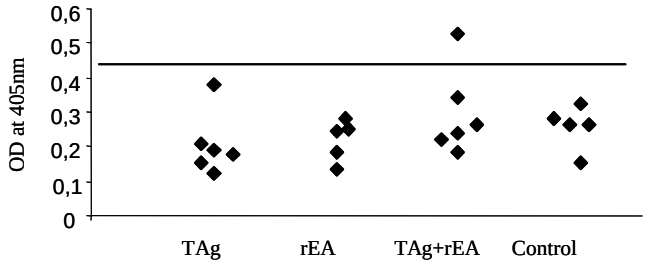


Fig. 5. Detection of specific anti-*T.gondii* IgA antibodies by ELISA in intestinal washes from six immunized mice with TAg alone or combined with rEA by the nasal route. The cut-off value (0.446) was calculated as the mean of five intestinal washes from untreated mice + 3 standard deviations. The horizontal solid line indicates positive cut-off. Results are for five to six mice per group compiled from two experiments.

Fig 6:

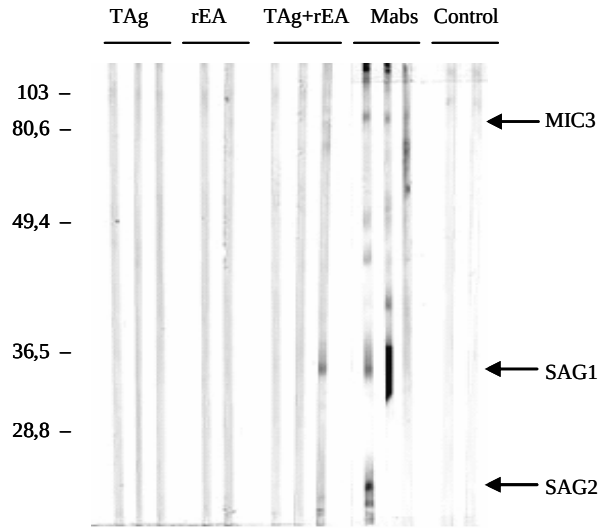


Fig. 6. Immunoblot analysis of the intestinal antibody response (IgA) of CBA/J mice after nasal immunization with TAg alone or combined with rEA. Intestinal washes were analysed for anti-*T. gondii* IgA 15 days after the last immunization. A *T. gondii* lysate was electrophoresed in a 10% SDS-polyachrylamide gel under non-reducing conditions, transferred to nitrocellulose and probed with intestinal washes from three TAg immunized mice, two rEA immunized mice, three TAg+rEA immunized mice, two control mice. The intestinal washes were first analysed by ELISA, a significant IgA response was observed only in one TAg+rEA immunized mouse (lane 3). The following monoclonal antibodies were used (in order): 3G11 (anti-SAG2), 1E5 (anti-SAG1), T42F3 (anti-MIC3).

Table 3: **Vaccine, Hedhli et *al***

Analyse of anti-*T.gondii* antibodies in sera of mice immunized with with 15µg of TAg alone or combined with 1µg of rEA on days 0, 14 and 28 by the nasal route.

Group	IgA	IgG
TAg	1\12	2\12
rEA	0\12	0\12
TAg+rEA	5\12	7\12
Control	0\12	0\12

Serum samples diluted to 1:10 were analysed by ELISA. Results are expressed as number of positive mice/number of analysed mice. Positive rates were determined by the cut off value which was calculated as the mean of sera from six untreated mice +10 standard deviations. Results are for 12 mice per immunized group compiled from two experiments.

3.6 Cellular immune response after immunization by nasal route

Culture supernatants of splenocytes and mesenteric lymph node cells of mice immunized by the nasal route were analysed for cytokine production (Fig.7). Only splenocytes of mice immunized by TAg combined with rEA and stimulated with TAg, produced specific amounts of IL-2 (Fig 7A). The IFN-γ levels were only slightly higher in mice immunized with TAg alone or combined with rEA. The observed individual variability indicated, as for the humoral immune response, that activated T cells occurred only in some mice. No specific release of IL-10 was produced and IL-4 (data not shown) was not detected in any group. After splenocytes stimulation with rEA (Fig 7B), individual variability was also observed. Some mice immunized with TAg combined with rEA produced specific amount of IL-2, IFN-γ and IL-10 while some mice immunized with rEA produced specific amount of IL-2 and IFN-γ. IL-2, IFN-γ, IL-10 and IL-4 were undetectable in any of the supernatants from mesenteric lymph node lymphocytes stimulated with TAg or rEA *in vitro* (data not shown). In our experimental conditions, the adjuvant activity of rEA is less efficient by the nasal route then by the intraperitoneal route.

3.7 Effective protection of vaccination with rEA by nasal route

After nasal immunization, no protection was observed in mice immunized with TAg alone (Fig 8), whereas mice immunized with TAg combined with rEA showed 50% reduction of cysts (1130±355) compared to control mice (2526±730; *P*=0,001). These results demonstrated the protective effect of total antigen combined with rEA as an adjuvant when used by nasal route against *T.gondii* infection.

Fig 7: **Vaccine, Hedhli et *al***

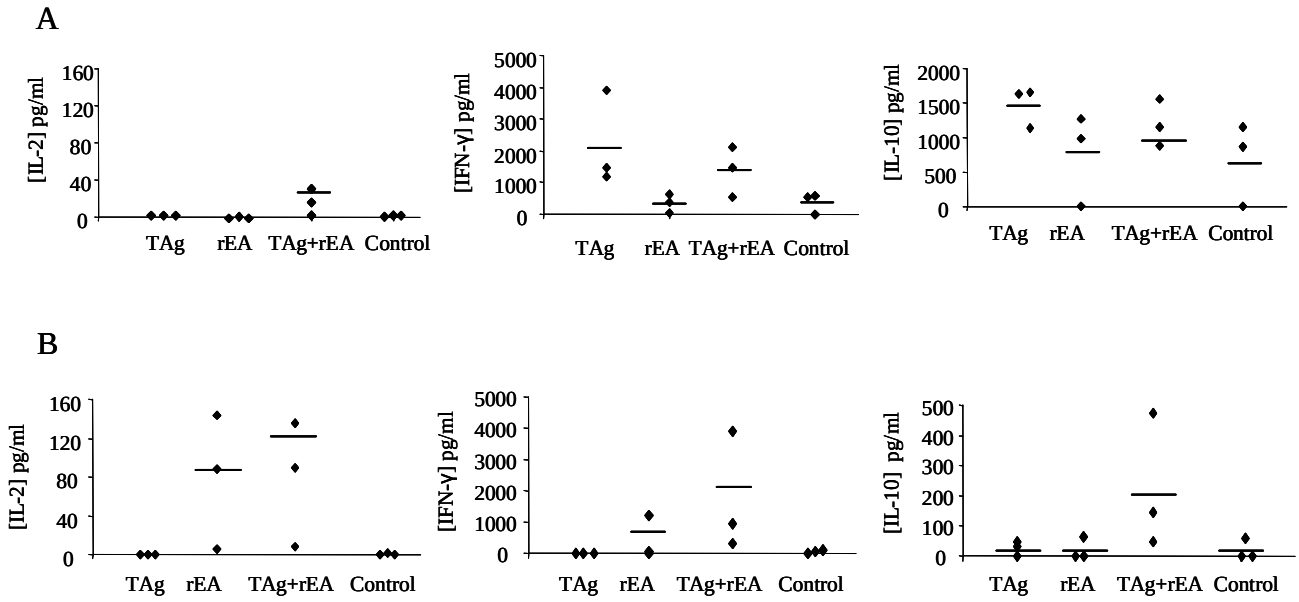


Fig. 7. Cellular response of splenocytes from CBA/J mice immunized by the nasal route with TAg alone, rEA alone or TAg combined with rEA, after stimulation by TAg (A) or rEA (B).

Mice were immunized with 15µg of TAg alone or combined with 1µg of rEA on days 0, 14 and 28 by the nasal route. Splenocytes were recovered 3 weeks after the last immunization

and cultured with 10 µg/ml TAg (A) or 2µg/ml rEA (B).

The results are representative data of two experiments.

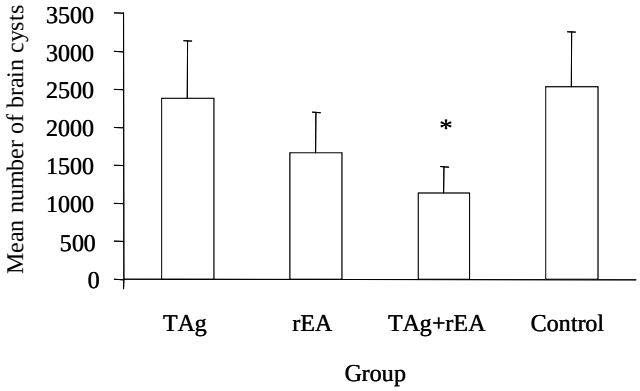


Fig. 8. Brain cyst load of CBA/J mice immunized by the nasal route with with 15µg of TAg alone or combined with 1µg of rEA on days 0, 14 and 28. Control mice were left untreated. Three weeks after the last immunization, the mice were orally infected with 70 cysts of 76K *T.gondii* strain. Brain cyst load was evaluated 1 month after challenge. Vaccination with TAg plus rEA significantly reduced the formation of brain cyst compared to control mice (**P*=0.001). Results from one of two similar experiments are shown

4. Discussion

This study shows for the fist time that *T. gondii* antigen combined with rEA, a recombinant *Eimeria* antigen, is a potent vaccine that elicits a strong specific immune response, as well as providing significant protection against *T. gondii* following intraperitoneal injection. We also demonstrated that *T .gondii* antigen combined with rEA provides significant protection following nasal administration.

Our results point out that rEA efficiently improves protection when used as an adjuvant in vaccination against *T. gondii*. rEA, a recombinant form of a profilin-like protein from *Eimeria* spp., is a potent modulator of the innate immune system (Rosenberg, Juckett et al. 2005). MyD88, an adaptator required for most TLR signaling, is crucial to the immunostimulatory activity induced by rEA in mice, presumably through TLR11 (Gowen, Smee et al. 2006). Recently, the *T. gondii* profilin-like protein has been identified as a TLR11 ligand. This receptor plays a critical role in the induction of the host protective cytokine IL-12 (Yarovinsky, Zhang et al. 2005). There is now evidence that related *Eimeria* and other apicomplexan protozoan profilins are recognized by TLR11 (Yarovinsky and Sher 2006).

Seven hours after the first intraperitoneal immunization, very high and specific IL-12 and IFN-γ amounts but no IL-10 were detected in the serum of mice treated with TAg combined with rEA whereas neither specific IL-12 nor IFN-γ nor IL-10 were detected in the serum of mice immunized with TAg alone. These results, as already demonstrated, confirm that rEA is a very potent stimulator of IL-12. Rosenberg *et al* (2005) showed that a 1 ng single intraperitoneal injection of rEA to mice increased plasma IL-12 levels. However, in our experimental conditions, TAg containing the *T. gondii* profilin (data not shown), the major inducer of IL-12, in the *T.gondii* soluble extract (Yarovinsky, Zhang et al. 2005), did not induce IL-12 in blood. Yarovinski *et al*. (2005) showed that intraperitoneal injection with 10µg of *T.gondii* soluble extract induced serum IL-12 responses. Plattner *et al* (2008) found that as few as 10^4 *T gondii* live parasites were sufficient for the induction of detectable IL-12 responses in wild type mice; yet no cytokine production was stimulated in $TLR11^{-/-}$. To measure IL-12 these authors analysed IL12p40 production whereas Rosenberg *et al* (2005) and our lab measured IL12p70 production. This difference in the method of cytokine analysis may explain the discrepancy rather then the low quantity of profilin in our TAg preparation.

Intraperitoneal immunization with rEA enhances both the humoral and cellular immune responses. Enhancement of the anti-*T.gondii* IgG antibody response in serum of TAg plus

rEA immunized mice compared to mice immunized with TAg alone, demonstrates that rEA induces a B cell response in addition to T cell responses. In fact B cells are required for vaccination-induced resistance to virulent tachyzoites in order to produce antibodies and that may function protectively *in vivo* by blocking infection of host cells by tachyzoites (Sayles, Gibson et al. 2000). The *T. gondii* antigens recognized by serum IgG antibodies were assessed by immunoblot. The intraperitoneal immunization with TAg combined with rEA or TAg alone triggered the IgG response to 22 and 30 kDa major bands and to 43, 45, 60 kDa minor bands. The two major bands and the 43 kDa minor band showed identical migration pattern to those of major well-known *T. gondii* antigens identified with Mabs (SAG1, 2 and 3). SAG1, the major surface antigen of the proliferative form of *T. gondii,* is involved in the invasion process. Antibodies to SAG1 inhibit host cell infection (Mineo, McLeod et al. 1993; Mineo and Kasper 1994). SAG1 is a well known protective antigen following parenteral and mucosal immunizations (Bhopale 2003). Therefore, specific immunity against this antigen could be involved in the induction of protective immunity.

The T-helper response of vaccinated mice was evaluated by analysis of the cytokines produced in the supernatant of TAg-restimulated splenocytes and by IgG subclass antibodies distribution in the sera. TAg-restimulated splenocytes from mice immunized with TAg combined with rEA released IL-2 and IFN-γ, whereas no specific release of IL-4 and IL-10 was observed. The predominance of anti-*T.gondii* IgG2a over IgG1 in sera also indicated that specific Th1 cells were mainly activated.

IFN-γ-mediated cellular immunity is required for the survival of mice in acute and chronic stages of infection (Suzuki, Orellana et al. 1988; Gazzinelli, Hakim et al. 1991) (Hakim, Gazzinelli et al. 1991). $CD4^+$ T cells are important for early IFN-γ production during *T. gondii* infection. $CD4^+$ T cells, through production of IL-2, are important for the induction of $CD8^+$ T cell response in *T. gondii*-infected hosts, as well as for the maintenance of $CD8^+$ T cell effector immunity (Gazzinelli, Hakim et al. 1991; Villegas, Elloso et al. 1999). $CD4^+$ T cells also contributed significantly to protection against chronic infection via their role as helper cells for production of isotype-switched antibodies (Johnson and Sayles 2002). IL-2 is also known to play an important role in immunity to *T. gondii*. IL2-/- mice showed increased susceptibility to toxoplasmosis correlated with the inability of these mice to produce INF-γ, although comparable levels of IL-12p40 production were detected in IL-2-/- and IL-2 +/+ *T. gondii* infected mice

(Villegas, Lieberman et al. 2002). One aim of a vaccination protocol is to be able to direct the T-helper response in the appropriate direction. For *T.gondii*, it has been demonstrated that a naturally occuring infection gives rise to Th1-biased response (Denkers and Gazzinelli 1998). This suggests that a good vaccination protocol will direct T-helper cells toward a Th1 rather then Th2 response.

No specific release of IL-2, IFN-γ, IL-4 and IL-10 was demonstrated in splenocytes supernatant from mice immunized with TAg alone. This lack of cytokines release is probably due to a weak activation of the cellular immune response. The distribution of IgG sub-types showed a predominance of anti-*T.gondii* IgG1 over IgG2a, suggesting a Th2-bias of the TAg. These results indicate that rEA was able to overcome the Th2-bias of the TAg and to enhance cell-mediated immune responses as well the humoral response. These results are in agreement with the ability of rEA to induce a strong IL-12 response. IL-12 activates T cell and NK cells to produce IFN-γ and IL-2 leading to a type 1 cellular immune response and induces IFN-γ dependent switching of IgG subtypes leading to inhibition of the IgG1 specific response (Gracie and Bradley 1996).

rEA was described by Laurent.F *et al*, as an immunodominant antigen of 19 kDa after immunization of mice with soluble parasite antigens. This 19 kDa antigen was located in the cytoplasm of *Eimeria tenella*, *E. maxima* and *E. falciformis* sporozoites, by immunofluorescence, indicating that this antigen is conserved among *Eimeria* species (Laurent, Bourdieu et al. 1994). The same homologous protein called 3-1E from *E. acervulina* was shown to induce antigen-specific proliferation and IFN-γ production of T lymphocytes obtained from *E. acervulina*-immune inbred chickens (Lillehoj, Choi et al. 2000). rEA immunization induced specific anti-rEA IgG antibodies (data not shown) and splenocytes restimulated with rEA produced specific amount of IL-2, IFN-γ and IL-10 suggesting a modulated Th1 response in mice immunized with rEA alone or combine with TAg. These results confirm the immunogenicity of rEA which has 67% homology with *T. gondii* profilin. In our experimental conditions, anti rEA-IgG antibodies did not recognize *T.gondii* profilin on immunoblot as well as by ELISA (data not shown). Futhermore splenocytes from mice immunized with rEA and restimulated with TAg did not produce specific cytokines. Together, these data indicate the absence of cross reactiviy between these proteins and this rule out the possibility that the immunogenicity of rEA could contribute to a protective immune response against *T.gondii*.

We then evaluated the protection induced by orally infecting vaccinated mice with 70 cysts of the *T. gondii* 76 strain. The protection against *T. gondii* was measured by the brain cyst load. An effective and significant degree of protection was obtained in mice immunized with TAg either alone or combined with rEA in comparison with control untreated mice. The co-administration of rEA and TAg significantly enhanced the protection against *T. gondii* infection when compared to TAg alone (36% versus 62% cyst reduction), which is in agreement with the immunostimulatory capacity of rEA. Mice immunized with rEA alone were not protected. These results demonstrate that the activation of the innate immune system alone or any specific anti-rEA immune responses did not induce protective immunity against *T. gondii.*

Finally, we have investigated the capacity of rEA to act as a mucosal adjuvant. The nasal route requires less antigen than the oral route because there is much less proteolytic activity and this route effectively promotes the production of both systemic and mucosal immune responses to an antigen (Bonenfant, Dimier-Poisson et al. 2001). In previous studies, we have shown that intranasal immunization with SAG1 plus cholera toxin or mutant nontoxic heat labile enterotoxin from toxigenic strains of *Escherichia coli* protect mice against *T. gondii*.(Debard, Buzoni-Gatel et al. 1996; Bonenfant, Dimier-Poisson et al. 2001).

Nasal delivery of TAg alone or TAg plus rEA as the adjuvant induced weak humoral responses in sera and intestinal site. However, anti-*T. gondii* IgG antibodies were detected in

the majority of mice sera (7/12) immunized by TAg combined with rEA whereas the majority of mice immunized with TAg alone didn't present any detectable anti-*T. gondii* IgG antibodies in their sera. In one mouse immunized with TAg plus rEA, intestinal anti-*T. gondii* IgA antibodies detected an antigen of about 30 kDa which showed identical migration pattern to SAG1. SAG1 was shown to induce immune protective immunity by the nasal route (Debard, Buzoni-Gatel et al. 1996; Bonenfant, Dimier-Poisson et al. 2001). The systemic cellular immune response was also weak. The individual humoral response variability indicated that activated T cells occurred only in some mice, whatever the immunized group and the antigen used for re-stimulation *in vitro*. Specific IL-2 production was observed only in mice immunized with TAg combined with rEA after splenocyte re-stimulation with TAg. Unfortunately local cellular response in mesenteric lymph nodes was too weak to be detected. The adjuvant activity of rEA is less efficient when administered by nasal route compared to the intraperitoneal route, however it was

still capable to overcome the Th2-bias of the TAg since, as for intraperitoneal immunization, a stronger IgG2a response was induced (data not shown). These results are in agreement with the fact that mice immunized with TAg combined with rEA were significantly protected (50% reduction cyst) whereas mice immunized with TAg alone were not protected compared to control mice.

Several TLR agonists such as TLR-2/6, 3, 4, 5, 9 agonists have been successfully used as mucosal adjuvants, particularly by the nasal route (Horner, Ronaghy et al. 1998; Baldridge, Yorgensen et al. 2000; Rharbaoui, Drabner et al. 2002; Ichinohe, Watanabe et al. 2005; Lee, Kim et al. 2006). With both parenteral and mucosal delivery, TLRs 3, 4, 9 agonists such as poly(I):poly(C), monophosphoryl lipid A and CpG oligonucleotides respectively, can shift the systemic cellular response towards a Th1 response (Roman, Martin-Orozco et al. 1997; Qureshi, Lariviere et al. 1999; Baldridge, Yorgensen et al. 2000; Horner and Raz 2000; Partidos, Hoebeke et al. 2005; Trumpfheller, Caskey et al. 2008). For example intranasal immunization of mice with a recombinant protective antigen of anthrax (rPA) and cholera toxin, a well known mucosal adjuvant, induced T cell responses of a Th2 type whereas intranasal immunisation of mice with CpG oligonucleotides as adjuvant induced T cell responses of a Th1 type (Boyaka, Tafaro et al. 2003). In our experimental conditions, only limited immune responses have been achieved when rEA was nasally administered however a significant protection was observed, suggesting a protective Th1 response as expected. rEA failed to fully stimulate the nasopharyngeal-associated lymphoreticular tissue (NALT), probably due to poor delivery. One possibility is that rEA is vulnerable to antigen-degrading enzymes and/or is poorly taken up from the mucosa barrier. Currently there is no data about TLR11 distribution in the NALT. TLR11 has been cloned and characterized by Zhang et al (2004) and protease-sensitive molecules in uropathogenic bacteria were the first described ligands of TLR11. (Zhang, Zhang et al. 2004; Yarovinsky, Zhang et al. 2005). Zhang et al. (2004) reported that TLR11 was strongly expressed in epithelial cells of kidney and bladder and to a less degree in liver epithelial cells. In contrast its expression was low in the spleen. These authors showed that TLR-11 was also expressed by blood cell types like macrophages. Other APCs cells, specially $CD8\alpha^{+}$ derived dendritic cells (DC) such as lymphoid DC cells and plasmacytoid dendritic cells (pDC), were shown to express TLR11 by others (Yarovinsky, Zhang et al. 2005; Pepper, Dzierszinski et al. 2008). At a mucosal site, the epithelial cells of the vaginal mucosa expressed TLR-11 (Yao, Fernandez et al. 2007). TLR11 is indeed expressed by immnune cells, more particulary

CD8+ DC and pDC cells which are both activated by *T. gondii* to present antigen and produce cytokines (Pepper, Dzierszinski et al. 2008). CD8+ DC and pDC are both inducers of immune responses following intranasal immunizations, which suggest that intranasal immunization with a TLR-11 agonist would be feasible. To further enhance the efficacy of rEA, a vaccine vehicle should protect vaccine components as well as rEA from degradation, enhance their uptake from mucosal surface and perhaps function itself as an adjuvant. Blander and Medzhitov found that an efficient antigen-specific CD4+ T cell response is induced only when the TLR agonist and antigen are present on the same particle and internalized into the same endocytic compartment (Blander and Medzhitov 2006). Futhermore, physical linkage of antigen to the *T. gondii* profilin used as a TLR-11 agonist, was found necessary to induce specific antigen CD4+ T cell response (Yarovinsky, Kanzler et al. 2006). These strategies could improve the adjuvancity of rEA, whatever the route of administration.

In conclusion, *Eimeria* profilin like protein would serve as an efficacious systemic and mucosal adjuvant inducing protective immune response against chronical stage of *T.gondii* infection.

5. Acknowledgments

This work was supported by the Frensh Embassy and Frensh cooperation institut of Tunis in Tunisia and IFR136 Agents Transmissibles et Infectiologie, INRA, Nouzilly, France. We thank Dr J.F.Dubremetz, Centre National de la Recherche Scientifique, Montpellier, France, for providing monoclonal antibodies against SAG1, SAG2, SAG3 and MIC3. We would like to thank Mr Haroon Akbar for blood test samples and Nathalie Moiré for kind gift of *Toxoplasma gondii* profilin, UMR 483 Université-INRA d'Immunologie Parasitaire, Vaccinologie et Biothérapie anti-infectieuse, UFR des Sciences Pharmaceutiques, 37200 Tours.

6. References

- Baldridge, J. R., Y. Yorgensen, et al. (2000). "Monophosphoryl lipid A enhances mucosal and systemic immunity to vaccine antigens following intranasal administration." Vaccine **18**(22): 2416-25.

- Barragan, A. and L. D. Sibley (2002). "Transepithelial migration of Toxoplasma gondii is linked to parasite motility and virulence." J Exp Med **195**(12): 1625-33.

- Bhopale, G. M. (2003). "Development of a vaccine for toxoplasmosis: current status." Microbes Infect **5**(5): 457-62.

- Blander, J. M. and R. Medzhitov (2006). "Toll-dependent selection of microbial antigens for presentation by dendritic cells." Nature **440**(7085): 808-12.

- Bliss, S. K., B. A. Butcher, et al. (2000). "Rapid recruitment of neutrophils containing prestored IL-12 during microbial infection." J Immunol **165**(8): 4515-21.

- Bonenfant, C., I. Dimier-Poisson, et al. (2001). "Intranasal immunization with SAG1 and nontoxic mutant heat-labile enterotoxins protects mice against Toxoplasma gondii." Infect Immun **69**(3): 1605-12.

- Bourguin, I., T. Chardes, et al. (1993). "Oral immunization with Toxoplasma gondii antigens in association with cholera toxin induces enhanced protective and cell-mediated immunity in C57BL/6 mice." Infect Immun **61**(5): 2082-8.

- Boyaka, P. N., A. Tafaro, et al. (2003). "Effective mucosal immunity to anthrax: neutralizing antibodies and Th cell responses following nasal immunization with protective antigen." J Immunol **170**(11): 5636-43.

- Buxton, D. (1998). "Protozoan infections (Toxoplasma gondii, Neospora caninum and Sarcocystis spp.) in sheep and goats: recent advances." Vet Res **29**(3-4): 289-310.

- Buzoni-Gatel, D., J. Schulthess, et al. (2006). "Mucosal defences against orally acquired protozoan parasites, emphasis on Toxoplasma gondii infections." Cell Microbiol **8**(4): 535-44.

- Chardes, T., I. Bourguin, et al. (1990). "Antibody responses to Toxoplasma gondii in sera, intestinal secretions, and milk from orally infected mice and characterization of target antigens." Infect Immun **58**(5): 1240-6.

- Chardes, T., F. Velge-Roussel, et al. (1993). "Mucosal and systemic cellular immune responses induced by Toxoplasma gondii antigens in cyst orally infected mice." Immunology **78**(3): 421-9.

- Davis, S. S. (2001). "Nasal vaccines." Adv Drug Deliv Rev **51**(1-3): 21-42.

- Debard, N., D. Buzoni-Gatel, et al. (1996). "Intranasal immunization with SAG1 protein of Toxoplasma gondii in association with cholera toxin dramatically reduces development of cerebral cysts after oral infection." Infect Immun **64**(6): 2158-66.

- Denkers, E. Y. and R. T. Gazzinelli (1998). "Regulation and function of T-cell-mediated immunity during Toxoplasma gondii infection." Clin Microbiol Rev **11**(4): 569-88.

- Fraser, C. K., K. R. Diener, et al. (2007). "Improving vaccines by incorporating immunological coadjuvants." Expert Rev Vaccines **6**(4): 559-78.

- Gazzinelli, R. T., F. T. Hakim, et al. (1991). "Synergistic role of CD4+ and CD8+ T lymphocytes in IFN-gamma production and protective immunity induced by an attenuated Toxoplasma gondii vaccine." J Immunol **146**(1): 286-92.

- Gazzinelli, R. T., S. Hieny, et al. (1993). "Interleukin 12 is required for the T-lymphocyte-independent induction of interferon gamma by an intracellular parasite and induces resistance in T-cell-deficient hosts." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(13): 6115-9.

- Gowen, B. B., D. F. Smee, et al. (2006). "Recombinant Eimeria protozoan protein elicits resistance to acute phlebovirus infection in mice but not hamsters." Antimicrob Agents Chemother **50**(6): 2023-9.

- Gracie, J. A. and J. A. Bradley (1996). "Interleukin-12 induces interferon-gamma-dependent switching of IgG alloantibody subclass." Eur J Immunol **26**(6): 1217-21.

- Hakim, F. T., R. T. Gazzinelli, et al. (1991). "CD8+ T cells from mice vaccinated against Toxoplasma gondii are cytotoxic for parasite-infected or antigen-pulsed host cells." J Immunol **147**(7): 2310-6.

- Horner, A. A. and E. Raz (2000). "Immunostimulatory sequence oligodeoxynucleotide: A novel mucosal adjuvant." Clin Immunol **95**(1 Pt 2): S19-29.

- Horner, A. A., A. Ronaghy, et al. (1998). "Immunostimulatory DNA is a potent mucosal adjuvant." Cell Immunol **190**(1): 77-82.

- Ichinohe, T., I. Watanabe, et al. (2005). "Synthetic double-stranded RNA poly(I:C) combined with mucosal vaccine protects against influenza virus infection." J Virol **79**(5): 2910-9.

- Ismael, A. B., D. Sekkai, et al. (2003). "The MIC3 gene of Toxoplasma gondii is a novel potent vaccine candidate against toxoplasmosis." Infect Immun **71**(11): 6222-8.

- Jakobi, V. and F. Petry (2008). "Humoral immune response in IL-12 and IFN-gamma deficient mice after infection with Cryptosporidium parvum." Parasite Immunol **30**(3): 151-61.

- Johnson, L. L. and P. C. Sayles (2002). "Deficient humoral responses underlie susceptibility to Toxoplasma gondii in CD4-deficient mice." Infect Immun **70**(1): 185-91.

- Julander, J. G., J. W. Judge, et al. (2007). "Prophylactic treatment with recombinant Eimeria protein, alone or in combination with an agonist cocktail, protects mice from Banzi virus infection." Antiviral Res **75**(1): 14-9.

- Kabelitz, D. and R. Medzhitov (2007). "Innate immunity--cross-talk with adaptive immunity through pattern recognition receptors and cytokines." Curr Opin Immunol **19**(1): 1-3.

- Kasper, L., N. Courret, et al. (2004). "Toxoplasma gondii and mucosal immunity." Int J Parasitol **34**(3): 401-9.

- Kim, L., B. A. Butcher, et al. (2006). "Toxoplasma gondii genotype determines MyD88-dependent signaling in infected macrophages." J Immunol **177**(4): 2584-91.

- Kraehenbuhl, J. P. and M. R. Neutra (1992). "Molecular and cellular basis of immune protection of mucosal surfaces." Physiol Rev **72**(4): 853-79.

- Laurent, F., C. Bourdieu, et al. (1994). "The immunodominant Eimeria acervulina sporozoite antigen previously described as p160/p240 is a 19-kilodalton antigen present in several Eimeria species." Mol Biochem Parasitol **63**(1): 79-86.

- Lee, S. E., S. Y. Kim, et al. (2006). "A bacterial flagellin, Vibrio vulnificus FlaB, has a strong mucosal adjuvant activity to induce protective immunity." Infect Immun **74**(1): 694-702.

- Lillehoj, H. S., K. D. Choi, et al. (2000). "A recombinant Eimeria protein inducing interferon-gamma production: comparison of different gene expression systems and immunization strategies for vaccination against coccidiosis." Avian Dis **44**(2): 379-89.

- Liu, C. H., Y. T. Fan, et al. (2006). "Cutting edge: dendritic cells are essential for in vivo IL-12 production and development of resistance against Toxoplasma gondii infection in mice." J Immunol **177**(1): 31-5.

- Mineo, J. R. and L. H. Kasper (1994). "Attachment of Toxoplasma gondii to host cells involves major surface protein, SAG-1 (P30)." Exp Parasitol **79**(1): 11-20.

- Mineo, J. R., R. McLeod, et al. (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." J Immunol **150**(9): 3951-64.

- Montoya, J. G. and J. S. Remington (2008). "Management of Toxoplasma gondii infection during pregnancy." Clin Infect Dis **47**(4): 554-66.

- Partidos, C. D., J. Hoebeke, et al. (2005). "The binding affinity of double-stranded RNA motifs to HIV-1 Tat protein affects transactivation and the neutralizing capacity of anti-Tat antibodies elicited after intranasal immunization." Eur J Immunol **35**(5): 1521-9.

- Pepper, M., F. Dzierszinski, et al. (2008). "Plasmacytoid dendritic cells are activated by Toxoplasma gondii to present antigen and produce cytokines." J Immunol **180**(9): 6229-36.

- Pulendran, B. and R. Ahmed (2006). "Translating innate immunity into immunological memory: implications for vaccine development." Cell **124**(4): 849-63.

- Qureshi, S. T., L. Lariviere, et al. (1999). "Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (Tlr4)." J Exp Med **189**(4): 615-25.

- Reis e Sousa, C., S. Hieny, et al. (1997). "In vivo microbial stimulation induces rapid CD40 ligand-independent production of interleukin 12 by dendritic cells and their redistribution to T cell areas." J Exp Med **186**(11): 1819-29.

- Rharbaoui, F., B. Drabner, et al. (2002). "The Mycoplasma-derived lipopeptide MALP-2 is a potent mucosal adjuvant." Eur J Immunol **32**(10): 2857-65.

- Roman, M., E. Martin-Orozco, et al. (1997). "Immunostimulatory DNA sequences function as T helper-1-promoting adjuvants." Nat Med **3**(8): 849-54.

- Rosenberg, B., D. A. Juckett, et al. (2005). "Protein from intestinal Eimeria protozoan stimulates IL-12 release from dendritic cells, exhibits antitumor properties in vivo and is correlated with low intestinal tumorigenicity." Int J Cancer **114**(5): 756-65.

- Sayles, P. C., G. W. Gibson, et al. (2000). "B cells are essential for vaccination-induced resistance to virulent Toxoplasma gondii." Infect Immun **68**(3): 1026-33.

- Scanga, C. A., J. Aliberti, et al. (2002). "Cutting edge: MyD88 is required for resistance to Toxoplasma gondii infection and regulates parasite-induced IL-12 production by dendritic cells." J Immunol **168**(12): 5997-6001.

- Suzuki, Y., M. A. Orellana, et al. (1988). "Interferon-gamma: the major mediator of resistance against Toxoplasma gondii." Science **240**(4851): 516-8.

- Trumpfheller, C., M. Caskey, et al. (2008). "The microbial mimic poly IC induces durable and protective CD4+ T cell immunity together with a dendritic cell targeted vaccine." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(7): 2574-9.

- Velge-Roussel, F., P. Marcelo, et al. (2000). "Intranasal immunization with Toxoplasma gondii SAG1 induces protective cells into both NALT and GALT compartments." Infect Immun **68**(2): 969-72.

- Villegas, E. N., M. M. Elloso, et al. (1999). "Role of CD28 in the generation of effector and memory responses required for resistance to Toxoplasma gondii." J Immunol **163**(6): 3344-53.

- Villegas, E. N., L. A. Lieberman, et al. (2002). "Susceptibility of interleukin-2-deficient mice to Toxoplasma gondii is associated with a defect in the production of gamma interferon." Infect Immun **70**(9): 4757-61.

- Yao, X. D., S. Fernandez, et al. (2007). "Expression of Toll-like receptors in murine vaginal epithelium is affected by the estrous cycle and stromal cells." J Reprod Immunol **75**(2): 106-19.

- Yap, G. S. and A. Sher (1999). "Cell-mediated immunity to Toxoplasma gondii: initiation, regulation and effector function." Immunobiology **201**(2): 240-7.

- Yarovinsky, F., H. Kanzler, et al. (2006). "Toll-like receptor recognition regulates immunodominance in an antimicrobial CD4+ T cell response." Immunity **25**(4): 655-64.

- Yarovinsky, F. and A. Sher (2006). "Toll-like receptor recognition of Toxoplasma gondii." Int J Parasitol **36**(3): 255-9.

- Yarovinsky, F., D. Zhang, et al. (2005). "TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein." Science **308**(5728): 1626-9.

- Zhang, D., G. Zhang, et al. (2004). "A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria." Science **303**(5663): 1522-6.

Discussion et perspectives

La toxoplasmose est une maladie sans gravité pour les sujets immunocompétents, toutefois des cas de toxoplasmoses oculaires ou de lymphadénopathies peuvent survenir. Si la toxoplasmose est contractée au cours d'une grossesse, des complications dues à la toxoplasmose congénitale peuvent survenir. En effet en cas de primo-infection en cours de grossesse les parasites traversent le placenta et infestent le fœtus. Survenu à un stade précoce de la grossesse elle peut entraîner la mort du fœtus *in utero* ou des malformations diverses, elle est d'autant moins grave quand elle survient aux stades tardifs de la grossesse. Le toxoplasme est également la cause de maladies qui touchent le système nerveux centrale chez le sujet immunodéprimé soit à cause d'une infection nouvellement contractée ou de la réactivation d'une ancienne infection. La toxoplasmose est donc de ce fait un problème de santé publique.

La toxoplasmose est également la cause d'avortements et de mortalité néonatale chez les ovins ce qui conduit à des pertes économiques considérables. De plus, les animaux infectés constituent un réservoir pour le parasite qui constitue une source d'infection pour l'homme (Dubey and Lindsay 2006; Buxton, Maley et al. 2007). Le développement d'une stratégie préventive est donc nécessaire, dans ce contexte une stratégie vaccinale semble attrayante.

Au cours de notre étude nous avons développé deux approches vaccinales basées sur l'utilisation des profiline des Apicomplexess contre la toxoplasmose chronique chez la souris, en tant qu'immunogène d'une part (profilines de *T. gondii* et de *N. caninum*) dans une stratégie de vaccination ADN optimisée (plasmide bicistronique pIRES optimisé) ou en tant qu'adjuvant (profiline de *E. tenella*, protéine recombinante rEA) dans une stratégie d'immunisation par voie intrapéritonéale et nasale avec de l'antigène de toxoplasme. Notre choix s'est basé sur le fait que la profiline de *T. gondii* a été décrite comme fortement immunogène. Elle induit une réponse cellulaire spécifique de type Th1, réponse dépendante de l'activation du TLR11. La capacité des profilines des Apicomplexess à activer la voie des TLRs puisqu'elles sont reconnues par le TLR11, et que l'activation de cette voie induit une réponse immune de type Th1 nécessaire à la mise en place d'une réponse immune efficace contre le toxoplasme, fait que ces protéines sont des adjuvants potentiellement intéressants.

Les profilines constituent une famille de protéines ubiquitaires (pour revue : (Jockusch, Murk et al. 2007). Elles sont présentes chez tous les organismes eucaryotes y compris les eucaryotes inférieures (Reichstein and Korn 1979; Ozaki, Sugino et al. 1983; Haugwitz,

Noegel et al. 1991; Cooley, Verheyen et al. 1992) les plantes (Staiger, Yuan et al. 1994) les invertébrés (Cooley, Verheyen et al. 1992; Somboonwiwat, Supungul et al. 2006) (Polet, Lambrechts et al. 2006) et les vertébrés (Witke, Podtelejnikov et al. 1998; Honore, Couvelard et al. 2000; Witke, Sutherland et al. 2001; Braun, Aszodi et al. 2002; Baum, Papenfuss et al. 2006). Les séquences en acides aminés diffèrent beaucoup d'une espèce animale ou végétale à une autre, jusqu'à moins de 25% d'homologie et peuvent même être très différentes au sein d'une même espèce. Les profilines ont une structure secondaire et tertiaire relativement bien conservée. Les profilines présentent en général trois domaines de liaison différents qui reconnaissent trois classes de ligands, un site de liaison à l'actine et aux ARP (« actine related proteins »), un site de liaison à la poly-L-proline (PLP) ainsi qu'un site de liaison au phosphatidylinositol lipides (PIP2). Chez les mammifères quatre gènes ont été identifiés, chez les plantes leur nombre est plus variable et peut aller jusqu'à dix. Les profilines des plantes ont depuis longtemps été décrites comme des agents allergènes responsables du déclanchement d'allergie (réponse cellulaire de type Th2) qui se traduit par la sécrétion des cytokines IL-4, IL-5 et IL-13 en réponse à l'exposition à l'allergène qui favorise la production des IgE par les lymphocytes B ainsi que le recrutement et l'activation des éosinophiles et des mastocystes (Lee, Geha et al. 1988; Valenta and Kraft 2001; Kleine-Tebbe and Herold 2003; Tao and He 2005) Contrairement aux profilines des plantes, les profilines des apicomplexes semblent déclencher une réponse immune de type Th1. En effet des études *in vitro* sur des cellules dendritiques stimulées par des profiline de *T. gondii* ou *E. tenella* recombinantes montrent que les CD sécrètent de l'IL-12 suite à leur reconnaissance par le TLR-11 (Rosenberg, Juckett et al. 2005; Yarovinsky, Zhang et al. 2005) ainsi que divers molécules pro-inflammatoires tel l'IFN-γ, le TNF-γ, l'IL-6 et MCP-1. De plus, *in vivo*, ces protéines induisent la production d'IL-12 sérique chez les souris (Rosenberg, Juckett et al. 2005). Une réponse cellulaire adaptative, spécifique de la profiline, dépendante de l'activation du TLR11, caractérisée par l'induction de lymphocytes T CD4+ spécifiques producteurs d'IFN-γ, se développe après immunisation avec un extrait parasitaire ou après infection avec des tachyzoïtes. Les profilines des apicomplexes présentent une séquence en acides aminés plus longue que les autres profilines de par la présence d'une séquence additionnelle de 25 acides aminés n'appartenant pas aux domaines de liaison à l'actine et à la poly-L-proline. Il est possible que cette séquence additionnelle abrite un domaine de reconnaissance du TLR-11 ceci expliquerait l'affinité des profilines des apicomplexa pour le TLR-11 murin.

Cependant l'intérêt porté à cette protéine est controversé du fait que son récepteur le TLR11 n'est pas forcément présent ou fonctionnel chez l'espèce cible. Chez l'homme les TLRs décrits sont les TLR1 à 10 (Takeshita, Tanaka et al. 2006), la découverte de la profiline comme ligand du TLR-11(Yarovinsky, Zhang et al. 2005) a conduit les scientifiques à rechercher l'existence de ce TLR chez l'homme. Chez l'homme la séquence codante pour le TLR-11 contient plusieurs codons stop par conséquent le gène ne s'exprime pas. Selon Balenga et *al* la réprime du gène de TLR11 éviterait une éventuelle interaction avec la profiline des cellules humaines (Balenga and Balenga 2007) car à ce jour, les ligands des TLRs décrits sont pour la majorité des composés spécifiques de pathogènes comme par exemple le lipopolysaccharide (LPS) ligand du TLR-4, le peptidoglycane (PGN) ligand du TLR2, l'acide lipoteichoic (LTA) ligand du TLR6, ou encore les motif CpG hypométhylés de l'ADN ligands du TLR9. Aucun de ces ligands présente une homologie avec les composants de la cellule de mammifère. Un composant protéique, non défini des bactéries uropathogènes a également été décrit comme ligand du TLR11 (Zhang, Zhang et al. 2004). L'absence d'un TLR11 fonctionnel chez l'homme pourrait expliquer sa sensibilité particulière aux infections urinaires (Zhang, Zhang et al. 2004). Chez l'espèce ovine, (Nalubamba, Gossner et al. 2007) ont recherché le TLR11 sans succès par PCR sur des ADN complémentaires obtenus à partir d'échantillons de divers tissus y compris la rate, les ganglions mésentériques ou encore des échantillon de reins, de peau ou de vessie ou sur différents types cellulaires du sang périphérique. Ils ont utilisé des amorces basées sur les séquences murines. Les séquences des TLR ovines présentent une homologie qui varie de 57 à 87% avec les séquences murines (une homologie de plus de 95% est observée avec les séquences bovines), il est possible que les amorces utilisées ne présentent pas suffisamment d'homologie avec les séquences ovines recherchées (Nalubamba, Gossner et *al.*, 2007). Par ailleurs, l'expression des TLR est très variable en fonction des tissus (Nalubamba, Gossner et *al.*, 2007), une très faible expression du TLR11 peut aussi contribuer aux résultats négatifs obtenus. En effet, nous avons réussi à détecter de l'IL-12p70 ovin dans les surnageants de cellules spléniques ovines enrichies en cellules dendritiques stimulées avec de la profiline de *T. gondii* (recombinante S2-profiline) 48h et 72h après culture (résultats non montrés, à confirmer). Pour notre étude, nous sommes partis d'une culture enrichie en cellules dendritiques spléniques tandis que Nalubamba et al., (2007) ont réalisé leur PCR quantitative sur un échantillon complet de rate, sachant que les cellules dendritiques sont faiblement représentées dans cet organe, il est possible que dans ces conditions la PCR ne soit pas

assez sensible pour détecter le TLR11 surtout s'il est faiblement exprimé. Il est a noter également que Rosenberg et al ont été amené a identifier la profiline d'*Eimeria* à partir de l'intestin (petit intestin) bovin lors de la recherche d'un composé capable de protéger l'intestin des vertébrés des tumeurs. Leur recherche s'est basée sur l'observation que certaines portions de l'intestin, en particulier chez les bovins, sont moins sujettes au développement de tumeurs que d'autres. La profiline d'*Eimeria* a été identifiée sur sa capacité à stimuler des cellules dendritiques murines, activité corrélée à une protection effective contre une tumeur murine (Rosenberg, Juckett et al. 2005). Chez les bovins, le TLR11 n'a pas encore été décrit, néanmoins ces résultats suggèrent que la profiline d'*Eimeria* joue un rôle sur l'activation du système immnunitaire bovin.

L'immunogénicité de la profiline de *T. gondii* ne dépend pas complètement de son intéraction avec le TLR11. Des cellules dendritiques de souris TLR11-/- sensibilisées *in vitro* avec la profiline de *T. gondii* sont capables d'activer des cellules CD4+ spécifiques de la profiline à des doses de 0,1 µg/ml et plus. La dépendance vis à vis du TLR11 est observé aux doses inférieures (0,01 et 0,001 µg/ml). La profiline est donc capable de stimuler les cellules immunes indépendamment du TLR-11. Ainsi, bien que le TLR11 ne soit pas présent chez les oiseaux en particulier le poulet (Temperley, Berlin et al. 2008), Song et *al.* ont montré l'efficacité de la profiline d'*Eimeria acervulina* utilisée en vaccination ADN à protéger les poulets vaccinés puis infectés avec *Eimeria acervulina* (Song, Lillehoj et al. 2000). Le nombre important de lymphocytes CD4+ par rapport au cellules CD8+ recrutés au niveau de la rate et du duodénum intraépithéliale après l'immunisation et l'infection laisse penser à l'immunodominance d'une réponse CD4+ suite à l'immunisation par la profiline. La même équipe avait montré au préalable que la protéine recombinante correspondante induisait la production d'IFN-γ chez le poulet (Lillehoj, Choi et al. 2000). Ces observations sont à corréler avec celles de Yarovinsky et al (Yarovinsky, Kanzler et al. 2006).
En conclusion, les profilines des apicomplexes restent des candidats vaccins potentiels, quelque soit l'espèce considérée.

Nous avons entrepris l'étude du potentiel vaccinant des profilines dans le cadre d'une vaccination ADN en utilisant un vecteur bicistronique pour exprimer l'antigène et la molécule adjuvante, le GM-CSF murin. Le clonage du gène de la profiline aussi bien de *T. gondii* ou de *N. caninum* a été réalisé au niveau du premier site de clonage multiple

du vecteur pIRES pour assurer une expression optimale du gène, en effet selon Hennecke et *al* l'initiation de la traducttion du premier gène (le premier gène en aval du promoteur) est dépendant de la coiffe 5' et est réalisé avec la même efficacité que dans un vecteur monocistronique, cependant la traduction du gène en aval de la séquence IRES est moindre (Hennecke, Kwissa et al. 2001). Le clonage d'une séquence signal en amont du gène de la profiline dans le but d'avoir une protéine sécrétée, plus disponible pour le système immunitaire, semble efficace puisqu' une protection a été obtenue avec cette construction contrairement à celle exprimant la profiline cytoplasmique. Cependant, les protéines exprimées par cette construction ont tendance à constituer des multimères. En effet, la séquence protéique de la profiline de *T.gondii* présente 5 cystéines qui permettent la formation de pont disulfures favorables à la miltimérisation de la protéine. La formation de multimères n'empêche pas d'induire des réponses humorales et cellulaires spécifiques dirigées contre la proteine recombinante suite à l'immunisation des souris CBA/J. Un cas de figure semblable a été décrit pas Martinez-Donato et *al* dont les travaux montrent que suite à la production de la protéine E2 de l'hépatite C par les cellules eucaryotes de *Pichia pastoris*, la protéine recombinante qui forme des multimères est détectée par les sérums de malades de l'hépatite C qui reconnaissent la protéine native. Cette protéine recombinante est capable également d'induire une forte réponse immune contre le virus de l'hépatite C (Martinez-Donato, Capdesuner et al. 2007). Néanmoins, les multimères de la protéine S2-profiline ne déclanchent pas la sécrétion de l'IL-12 *in vivo*. La synthèse d'Il-12 a été détectée seulement après l'injection aux souris de la protéine S2-profiline traitée avec le DTT qui réduit les ponts disulfures. Afin d'optimiser la production de cette cytokine, les cystéines de la profiline pourraient être modifiées par mutation dirigée pour éviter la formation des ponts disulfures et par conséquent la formation de multimères. Cependant, le risque de changer la conformation de la protéine existe.

Les résultats que nous avons obtenus nous permettent de considérer que la profiline de *T. gondii* est un candidat vaccin qui pourra entrer dans la composition d'un vaccin multigénique contre *T. gondii*. En effet, jusqu'à présent les protections conférées par les différents antigènes étudiés y compris la profiline, restent partielles, l'association de plusieurs antigènes semble nécessaire pour améliorer les protections (Mevelec, Bout et al. 2005; Dautu, Munyaka et al. 2007).

Comme stratégie d'optimisation de la vaccination contre le toxoplasme nous avons également évalué l'effet adjuvant d'un agoniste de TLR, la profiline d'*Eimeria tenella* (protéine recombinante rEA). Les agonistes de TLR en traitement prophylactique et thérapeutique des maladies infectieuses s'avèrent efficaces (Meyer and Stockfleth 2008), y compris dans notre étude avec un agoniste du TLR11 contre l'infection chronique de la toxoplasmose. L'effet de l'agoniste pourrait être augmenté par une liaison physique avec l'antigène vaccinant. Yarovinsky et *al* ont observé une augmentation significative des réponses immunes dirigées contre l'OVA suite à sa fusion avec la profiline de *T.gondii* (Yarovinsky, Kanzler et al. 2006). Par ailleurs, cette approche a déjà été évaluée avec succès dans différentes études. Par exemple, la protéine Gag du VIH, conjuguée à un agoniste du TLR7/8 (3M-012), induit des réponses immunes CD4+ et CD8+ supérieures à celles induites par la co-administration de la protéine Gag et de l'agoniste (Wille-Reece, Flynn et al. 2005).

Une autre stratégie possible pour optimiser la vaccination contre le toxoplasme est la combinaison de plusieurs ligands de TLR pour stimuler au maximum le système immunitaire. En effet, Ma et *al* ont montré que l'utilisation combinée d'un CpG-ODN ligand du TLR-9 et du R-848 ligand du TLR7, augmente d'avantage la réponse immune dans une stratégie de vaccination contre le virus de l'hépatite B (Ma, Du et al. 2007) que chaque ligand évalué séparément. Ainsi les ligands des TLRs impliqués dans la reconnaissance et la signalisation du toxoplasme pourraient être utilisés simultanément comme adjuvants puisque plusieurs TLR semblent impliqués dans la protection contre *T.gondii* (Hitziger, Dellacasa et al. 2005).

Finalement, compte tenu du fait que la distribution des TLRs est variable non seulement d'un tissu à un autre, mais également entre les espèces, une stratégie basée sur les molécules adaptatrices impliquées dans les voies de signalisation des TLR peut être développée. A titre d'exemple, chez l'homme, le TLR9 est exprimé uniquement par les CD plasmacytoides et les lymphocytes B, la réponse immune chez l'homme suite à l'activation du TLR9 est donc dépendante des facteurs produits par la stimulation de ces deux types cellulaires. Tandis que chez la souris, le TLR9 est exprimé non seulement par les CD plasmacytoides et les lymphocytes B mais aussi par les autres cellules dendritiques ainsi que les macrophages (Kadowaki, Ho et al. 2001). La réponse observée chez la souris n'est donc pas superposable à l'homme (ou une autre espèce) dans tous les

cas. Une stimulation de la voie de signalisation des TLR, sans utiliser un agoniste, peut ëtre obtenue en surexprimant les molécules adaptatrices dans la cellule. Cette approche a été utilisée par Takesita et al (2006). Ces auteurs ont immunisé des souris avec des plasmides exprimant simultanément un gène rapporteur, la β-galactosidase d'une part et la molécule adaptatrice TRIF ou MyD88 d'autre part. La co-expression de MyD88 a conduit à une augmentation de la réponse humorale, alors que la co-expression de la molécule TRIF a conduit à une augmentation de la réponse cellulaire (Takeshita, Tanaka et al. 2006). Cette stratégie appliquée à la molécule TRIF et à l'antigène HA du virus de la grippe et à la protéine tumorale E7 protège les souris contre une infection au virus de la grippe ou contre l'évolution des cellules tumorales suite à l'augmentation des réponses humorales et cellulaires dirigées contre l'antigène en question (Takeshita, Tanaka et al. 2006).

Finalement, la vectorisation aussi bien de l'ADN vaccinant que de l'antigène protéique avec des agonistes de TLR peut être envisagée. Suite à l'injection de l'ADN par voie intramusculaire, celui-ci est dégradé dans sa majorité ce qui réduit l'efficacité de l'immunisation et oblige à utiliser des quantités importantes d'ADN. Cette dégradation est encore plus importante dans le milieu muqueux. De même les antigènes sont rapidement dégradés par l'activité protéolytique au niveau des muqueuses. Or plusieurs études ont souligné l'efficacité de l'immunisation par voie muqueuse à induire une réponse locale et systémique dirigée contre le toxoplasme (Debard, Buzoni-Gatel et al. 1996; Bonenfant, Dimier-Poisson et al. 2001; Igarashi, Kano et al. 2008). Ainsi, l'effet adjuvant d'agonistes des TLR3 et 9 est augmenté lorsque ces agonistes sont complexés avec des liposomes en présence de l'ADN vaccinant (Zaks, Jordan et al. 2006). De même, un lipopreptide de 25 acides aminés de l'antigène tumoral MUC1, complexé avec des liposomes en présence de MPL, agoniste du TLR4, a une activité anti-tumorale augmentée, associée à une augmentation de la réponse cellulaire (Butts, Murray et al. 2005). Ce vaccin est en cours d'essai clinique.

La notion d'antigène immunodominant suite à une infection reste à confirmer. En effet, toutes les souris infectées par voie orale avec la souche 76K ou par voie intrapéritonéale avec la souche RH délétée des gènes MIC3 et MIC1 ne développent pas de réponse cellulaire spécifique (par dosage de l'IFN-g après stimulation in vitro des splénocytes avec la protéine recombinante S2-profiline). Il en est de même, pour la réponse humorale sérique. Ces derniers résultats sont à corréler avec ceux de Laurent et

al. (1994) qui n'ont pas observé de réponse humorale après infection de poulet alors qu'une forte réponse humorale est obtenue chez le lapin ou le poulet immunisé (Song, Lillehoj et al. 2000). D'autant plus que utilisé en vaccination ou en traitement thérapeutique anti-cancéreux cet antigène déclanche la sécrétion d'un panel de molécules pro-inflammatoires témoins de l'orientation de la réponse immune vers une réponse Th1 (Lillehoj, Choi et al. 2000; Rosenberg, Juckett et al. 2005) ; Hedhli et *al* 2008 (soumis).

En conclusion, pour le développement d'une stratégie vaccinale efficace contre *T.gondii*, il serait intéressant d'homogénéiser les modèles d'études utilisées (souris et souches) pour rendre ainsi plus aisée la comparaison entre les différentes études. Ceci aidera à une meilleure compréhension des mécanismes de protection et permettra d'élaborer une stratégie vaccinale efficace.

Références bibliographiques

Adams, L. B., J. B. Hibbs, Jr., et al. (1990). "Microbiostatic effect of murine-activated macrophages for Toxoplasma gondii. Role for synthesis of inorganic nitrogen oxides from L-arginine." J Immunol **144**(7): 2725-9.

Ajzenberg, D., A. L. Banuls, et al. (2002). "Microsatellite analysis of Toxoplasma gondii shows considerable polymorphism structured into two main clonal groups." Int J Parasitol **32**(1): 27-38.

Ajzenberg, D., N. Cogne, et al. (2002). "Genotype of 86 Toxoplasma gondii isolates associated with human congenital toxoplasmosis, and correlation with clinical findings." J Infect Dis **186**(5): 684-9.

Akira, S., K. Takeda, et al. (2001). "Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity." Nat Immunol **2**(8): 675-80.

Alexander, D. L., J. Mital, et al. (2005). "Identification of the moving junction complex of Toxoplasma gondii: a collaboration between distinct secretory organelles." PLoS Pathog **1**(2): e17.

Alexopoulou, L., V. Thomas, et al. (2002). "Hyporesponsiveness to vaccination with Borrelia burgdorferi OspA in humans and in TLR1- and TLR2-deficient mice." Nat Med **8**(8): 878-84.

Alfano, M., H. Schmidtmayerova, et al. (1999). "The B-oligomer of pertussis toxin deactivates CC chemokine receptor 5 and blocks entry of M-tropic HIV-1 strains." J Exp Med **190**(5): 597-605.

Aliberti, J., D. Jankovic, et al. (2004). "Turning it on and off: regulation of dendritic cell function in Toxoplasma gondii infection." Immunol Rev **201**: 26-34.

Aliberti, J., C. Reis e Sousa, et al. (2000). "CCR5 provides a signal for microbial induced production of IL-12 by CD8 alpha+ dendritic cells." Nat Immunol **1**(1): 83-7.

Aliberti, J., C. Serhan, et al. (2002). "Parasite-induced lipoxin A4 is an endogenous regulator of IL-12 production and immunopathology in Toxoplasma gondii infection." J Exp Med **196**(9): 1253-62.

Aliberti, J., J. G. Valenzuela, et al. (2003). "Molecular mimicry of a CCR5 binding-domain in the microbial activation of dendritic cells." Nat Immunol **4**(5): 485-90.

Aline, F., D. Bout, et al. (2002). "Dendritic cells as effector cells: gamma interferon activation of murine dendritic cells triggers oxygen-dependent inhibition of Toxoplasma gondii replication." Infect Immun **70**(5): 2368-74.

Amer, A. O. and M. S. Swanson (2002). "A phagosome of one's own: a microbial guide to life in the macrophage." Curr Opin Microbiol **5**(1): 56-61.

Angus, C. W., D. Klivington-Evans, et al. (2000). "Immunization with a DNA plasmid encoding the SAG1 (P30) protein of Toxoplasma gondii is immunogenic and protective in rodents." J Infect Dis **181**(1): 317-24.

Araujo, F. G. (1994). "Immunization against Toxoplasma gondii." Parasitol Today **10**(9): 358-60.

Atanackovic, D., N. K. Altorki, et al. (2004). "Vaccine-induced CD4+ T cell responses to MAGE-3 protein in lung cancer patients." J Immunol **172**(5): 3289-96.

Bachmann, M. F., M. Kopf, et al. (2006). "Chemokines: more than just road signs." Nat Rev Immunol **6**(2): 159-64.

Bacon, C. M., E. F. Petricoin, 3rd, et al. (1995). "Interleukin 12 induces tyrosine phosphorylation and activation of STAT4 in human lymphocytes." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(16): 7307-11.

Balenga, N. A. and N. A. Balenga (2007). "Human TLR11 gene is repressed due to its probable interaction with profilin expressed in human." Med Hypotheses **68**(2): 456.

Barouch, D. H., S. Santra, et al. (2002). "Potent CD4+ T cell responses elicited by a bicistronic HIV-1 DNA vaccine expressing gp120 and GM-CSF." J Immunol **168**(2): 562-8.

Barragan, A. and L. D. Sibley (2002). "Transepithelial migration of Toxoplasma gondii is linked to parasite motility and virulence." J Exp Med **195**(12): 1625-33.

Barry, M. and C. Cooper (2007). "Review of hepatitis B surface antigen-1018 ISS adjuvant-containing vaccine safety and efficacy." Expert Opin Biol Ther **7**(11): 1731-7.

Barry, M. E., D. Pinto-Gonzalez, et al. (1999). "Role of endogenous endonucleases and tissue site in transfection and CpG-mediated immune activation after naked DNA injection." Hum Gene Ther **10**(15): 2461-80.

Basner-Tschakarjan, E., A. Mirmohammadsadegh, et al. (2004). "Uptake and trafficking of DNA in keratinocytes: evidence for DNA-binding proteins." Gene Ther **11**(9): 765-74.

Baum, J., A. T. Papenfuss, et al. (2006). "Regulation of apicomplexan actin-based motility." Nat Rev Microbiol **4**(8): 621-8.

Baumeister, W., J. Walz, et al. (1998). "The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease." Cell **92**(3): 367-80.

Beghetto, E., H. V. Nielsen, et al. (2005). "A combination of antigenic regions of Toxoplasma gondii microneme proteins induces protective immunity against oral infection with parasite cysts." J Infect Dis **191**(4): 637-45.

Beghetto, E., A. Spadoni, et al. (2003). "Molecular dissection of the human B-cell response against Toxoplasma gondii infection by lambda display of cDNA libraries." Int J Parasitol **33**(2): 163-73.

Bennouna, S., S. K. Bliss, et al. (2003). "Cross-talk in the innate immune system: neutrophils instruct recruitment and activation of dendritic cells during microbial infection." J Immunol **171**(11): 6052-8.

Bernstein, D. I., R. L. Miller, et al. (1993). "Adjuvant effects of imiquimod on a herpes simplex virus type 2 glycoprotein vaccine in guinea pigs." J Infect Dis **167**(3): 731-5.

Bienzle, U., M. Gunther, et al. (2002). "Successful hepatitis B vaccination in patients who underwent transplantation for hepatitis B virus-related cirrhosis: preliminary results." Liver Transpl **8**(6): 562-4.

Boehm, U., T. Klamp, et al. (1997). "Cellular responses to interferon-gamma." Annu Rev Immunol **15**: 749-95.

Bohne, W., J. Heesemann, et al. (1994). "Reduced replication of Toxoplasma gondii is necessary for induction of bradyzoite-specific antigens: a possible role for nitric oxide in triggering stage conversion." Infect Immun **62**(5): 1761-7.

Bomford, R. (1980). "The comparative selectivity of adjuvants for humoral and cell-mediated immunity. II. Effect on delayed-type hypersensitivity in the mouse and guinea pig, and cell-mediated immunity to tumour antigens in the mouse of Freund's incomplete and complete adjuvants, alhydrogel, Corynebacterium parvum, Bordetella pertussis, muramyl dipeptide and saponin." Clin Exp Immunol **39**(2): 435-41.

Bonenfant, C., I. Dimier-Poisson, et al. (2001). "Intranasal immunization with SAG1 and nontoxic mutant heat-labile enterotoxins protects mice against Toxoplasma gondii." Infect Immun **69**(3): 1605-12.

Boothroyd, J. C. (1993). "Population Biology of Toxoplasma - Clonality, Virulence, and Speciation (or Not)." **2**(2): 100-102.

Boothroyd, J. C. and M. E. Grigg (2002). "Population biology of Toxoplasma gondii and its relevance to human infection: do different strains cause different disease?" Curr Opin Microbiol **5**(4): 438-42.

Boyle, J. S., C. Koniaras, et al. (1997). "Influence of cellular location of expressed antigen on the efficacy of DNA vaccination: cytotoxic T lymphocyte and antibody responses are suboptimal when antigen is cytoplasmic after intramuscular DNA immunization." Int Immunol **9**(12): 1897-906.

Braun, A., A. Aszodi, et al. (2002). "Genomic organization of profilin-III and evidence for a transcript expressed exclusively in testis." Gene **283**(1-2): 219-25.

Brown, C. R. and R. McLeod (1990). "Class I MHC genes and CD8+ T cells determine cyst number in Toxoplasma gondii infection." J Immunol **145**(10): 3438-41.

Brunet, L. R. (2001). "Nitric oxide in parasitic infections." Int Immunopharmacol **1**(8): 1457-67.

Bryant, P. and H. Ploegh (2004). "Class II MHC peptide loading by the professionals." Curr Opin Immunol **16**(1): 96-102.

Budker, V., T. Budker, et al. (2000). "Hypothesis: naked plasmid DNA is taken up by cells in vivo by a receptor-mediated process." J Gene Med **2**(2): 76-88.

Buffolano, W., E. Beghetto, et al. (2005). "Use of recombinant antigens for early postnatal diagnosis of congenital toxoplasmosis." J Clin Microbiol **43**(12): 5916-24.

Bulow, R. and J. C. Boothroyd (1991). "Protection of mice from fatal Toxoplasma gondii infection by immunization with p30 antigen in liposomes." J Immunol **147**(10): 3496-500.

Burke, J. M., C. W. Roberts, et al. (1994). "Temporal differences in the expression of mRNA for IL-10 and IFN-gamma in the brains and spleens of C57BL/10 mice infected with Toxoplasma gondii." Parasite Immunol **16**(6): 305-14.

Butcher, B. A., R. I. Greene, et al. (2005). "p47 GTPases regulate Toxoplasma gondii survival in activated macrophages." Infect Immun **73**(6): 3278-86.

Butts, C., N. Murray, et al. (2005). "Randomized phase IIB trial of BLP25 liposome vaccine in stage IIIB and IV non-small-cell lung cancer." J Clin Oncol **23**(27): 6674-81.

Buxton, D. and J. Finlayson (1986). "Experimental infection of pregnant sheep with Toxoplasma gondii: pathological and immunological observations on the placenta and foetus." J Comp Pathol **96**(3): 319-33.

Buxton, D. and E. A. Innes (1995). "A commercial vaccine for ovine toxoplasmosis." Parasitology **110 Suppl**: S11-6.

Buxton, D., S. W. Maley, et al. (2007). "Ovine toxoplasmosis: transmission, clinical outcome and control." Parassitologia **49**(4): 219-21.

Buxton, D., K. Thomson, et al. (1991). "Vaccination of sheep with a live incomplete strain (S48) of Toxoplasma gondii and their immunity to challenge when pregnant." Vet Rec **129**(5): 89-93.

Buzoni-Gatel, D., H. Debbabi, et al. (2001). "Murine ileitis after intracellular parasite infection is controlled by TGF-beta-producing intraepithelial lymphocytes." Gastroenterology **120**(4): 914-24.

Buzoni-Gatel, D., H. Debbabi, et al. (1999). "Intraepithelial lymphocytes traffic to the intestine and enhance resistance to Toxoplasma gondii oral infection." J Immunol **162**(10): 5846-52.

Buzoni-Gatel, D., A. C. Lepage, et al. (1997). "Adoptive transfer of gut intraepithelial lymphocytes protects against murine infection with Toxoplasma gondii." J Immunol **158**(12): 5883-9.

Buzoni-Gatel, D., J. Schulthess, et al. (2006). "Mucosal defences against orally acquired protozoan parasites, emphasis on Toxoplasma gondii infections." Cell Microbiol **8**(4): 535-44.

Buzoni-Gatel, D. and C. Werts (2006). "Toxoplasma gondii and subversion of the immune system." Trends Parasitol **22**(10): 448-52.

Carey, K. L., C. G. Donahue, et al. (2000). "Identification and molecular characterization of GRA8, a novel, proline-rich, dense granule protein of Toxoplasma gondii." Mol Biochem Parasitol **105**(1): 25-37.

Carruthers, V. B. and L. D. Sibley (1997). "Sequential protein secretion from three distinct organelles of Toxoplasma gondii accompanies invasion of human fibroblasts." Eur J Cell Biol **73**(2): 114-23.

Carruthers, V. B. and L. D. Sibley (1997). "Sequential protein secretion from three distinct organelles of Toxoplasma gondii accompanies invasion of human fibroblasts." **73**(2): 114-123.

Casares, S., K. Inaba, et al. (1997). "Antigen presentation by dendritic cells after immunization with DNA encoding a major histocompatibility complex class II-restricted viral epitope." J Exp Med **186**(9): 1481-6.

Casciotti, L., K. H. Ely, et al. (2002). "CD8(+)-T-cell immunity against Toxoplasma gondii can be induced but not maintained in mice lacking conventional CD4(+) T cells." Infect Immun **70**(2): 434-43.

Cerede, O., J. F. Dubremetz, et al. (2002). "The Toxoplasma gondii protein MIC3 requires pro-peptide cleavage and dimerization to function as adhesin." Embo J **21**(11): 2526-36.

Cerede, O., J. F. Dubremetz, et al. (2005). "Synergistic role of micronemal proteins in Toxoplasma gondii virulence." J Exp Med **201**(3): 453-63.

Cha, D. Y., I. K. Song, et al. (2001). "Effects of specific monoclonal antibodies to dense granular proteins on the invasion of Toxoplasma gondii in vitro and in vivo." Korean J Parasitol **39**(3): 233-40.

Chang, H. R. and J. C. Pechere (1989). "Macrophage oxidative metabolism and intracellular Toxoplasma gondii." Microb Pathog **7**(1): 37-44.

Chao, C. C., W. R. Anderson, et al. (1993). "Activated microglia inhibit multiplication of Toxoplasma gondii via a nitric oxide mechanism." Clin Immunol Immunopathol **67**(2): 178-83.

Chao, C. C., G. Gekker, et al. (1994). "Human microglial cell defense against Toxoplasma gondii. The role of cytokines." J Immunol **152**(3): 1246-52.

Chardes, T., I. Bourguin, et al. (1990). "Antibody responses to Toxoplasma gondii in sera, intestinal secretions, and milk from orally infected mice and characterization of target antigens." Infect Immun **58**(5): 1240-6.

Chardes, T., D. Buzoni-Gatel, et al. (1994). "Toxoplasma gondii oral infection induces specific cytotoxic CD8 alpha/beta+ Thy-1+ gut intraepithelial lymphocytes, lytic for parasite-infected enterocytes." J Immunol **153**(10): 4596-603.

Chardes, T., F. Velge-Roussel, et al. (1993). "Mucosal and systemic cellular immune responses induced by Toxoplasma gondii antigens in cyst orally infected mice." Immunology **78**(3): 421-9.

Charron, A. J. and L. D. Sibley (2002). "Host cells: mobilizable lipid resources for the intracellular parasite Toxoplasma gondii." J Cell Sci **115**(Pt 15): 3049-59.

Chattergoon, M. A., T. M. Robinson, et al. (1998). "Specific immune induction following DNA-based immunization through in vivo transfection and activation of macrophages/antigen-presenting cells." J Immunol **160**(12): 5707-18.

Chaudhary, K., J. A. Darling, et al. (2004). "Purine salvage pathways in the apicomplexan parasite Toxoplasma gondii." J Biol Chem **279**(30): 31221-7.

Chen, M., H. S. Mun, et al. (2003). "Induction of protective immunity by primed B-1 cells in Toxoplasma gondii -infected B cell-deficient mice." Microbiol Immunol **47**(12): 997-1003.

Chow, Y. H., W. L. Huang, et al. (1997). "Improvement of hepatitis B virus DNA vaccines by plasmids coexpressing hepatitis B surface antigen and interleukin-2." J Virol **71**(1): 169-78.

Ciechanover, A. (2005). "Proteolysis: from the lysosome to ubiquitin and the proteasome." Nat Rev Mol Cell Biol **6**(1): 79-87.

Cluff, C. W., J. R. Baldridge, et al. (2005). "Synthetic toll-like receptor 4 agonists stimulate innate resistance to infectious challenge." Infect Immun **73**(5): 3044-52.

Cochereau-Massin, I., P. LeHoang, et al. (1992). "Ocular toxoplasmosis in human immunodeficiency virus-infected patients." Am J Ophthalmol **114**(2): 130-5.

Coleman, J. W. (2001). "Nitric oxide in immunity and inflammation." Int Immunopharmacol **1**(8): 1397-406.

Collazo, C. M., G. S. Yap, et al. (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." J Exp Med **194**(2): 181-8.

Combe, C. L., T. J. Curiel, et al. (2005). "NK cells help to induce CD8(+)-T-cell immunity against Toxoplasma gondii in the absence of CD4(+) T cells." Infect Immun **73**(8): 4913-21.

Cooley, L., E. Verheyen, et al. (1992). "chickadee encodes a profilin required for intercellular cytoplasm transport during Drosophila oogenesis." Cell **69**(1): 173-84.

Cooper, C. L., H. L. Davis, et al. (2004). "CPG 7909, an immunostimulatory TLR9 agonist oligodeoxynucleotide, as adjuvant to Engerix-B HBV vaccine in healthy adults: a double-blind phase I/II study." J Clin Immunol **24**(6): 693-701.

Coppens, I., J. D. Dunn, et al. (2006). "Toxoplasma gondii sequesters lysosomes from mammalian hosts in the vacuolar space." Cell **125**(2): 261-74.

Coppens, I., A. P. Sinai, et al. (2000). "Toxoplasma gondii exploits host low-density lipoprotein receptor-mediated endocytosis for cholesterol acquisition." J Cell Biol **149**(1): 167-80.

Corr, M., D. J. Lee, et al. (1996). "Gene vaccination with naked plasmid DNA: mechanism of CTL priming." J Exp Med **184**(4): 1555-60.

Costa-Silva, T. A., C. S. Meira, et al. (2008). "Evaluation of immunization with tachyzoite excreted-secreted proteins in a novel susceptible mouse model (A/Sn) for Toxoplasma gondii." Exp Parasitol.

Couper, K. N., H. V. Nielsen, et al. (2003). "DNA vaccination with the immunodominant tachyzoite surface antigen (SAG-1) protects against adult acquired Toxoplasma gondii infection but does not prevent maternofoetal transmission." Vaccine **21**(21-22): 2813-20.

Courret, N., S. Darche, et al. (2006). "CD11c- and CD11b-expressing mouse leukocytes transport single Toxoplasma gondii tachyzoites to the brain." Blood **107**(1): 309-16.

Couvreur, J. and P. Thulliez (1996). "[Acquired toxoplasmosis of ocular or neurologic site: 49 cases]." Presse Med **25**(9): 438-42.

Cresswell, P., A. L. Ackerman, et al. (2005). "Mechanisms of MHC class I-restricted antigen processing and cross-presentation." Immunol Rev **207**: 145-57.

Cresswell, P., N. Bangia, et al. (1999). "The nature of the MHC class I peptide loading complex." Immunol Rev **172**: 21-8.

Cui, Y. L., S. Y. He, et al. (2008). "Protective effect of a multiantigenic DNA vaccine against Toxoplasma gondii with co-delivery of IL-12 in mice." Parasite Immunol **30**(5): 309-13.

Curiel, T. J., E. C. Krug, et al. (1993). "Cloned human CD4+ cytotoxic T lymphocytes specific for Toxoplasma gondii lyse tachyzoite-infected target cells." J Immunol **151**(4): 2024-31.

Darcy, F., D. Deslee, et al. (1988). "Induction of a protective antibody-dependent response against toxoplasmosis by in vitro excreted/secreted antigens from tachyzoites of Toxoplasma gondii." Parasite Immunol **10**(5): 553-67.

Datta, S. K., V. Redecke, et al. (2003). "A subset of Toll-like receptor ligands induces cross-presentation by bone marrow-derived dendritic cells." J Immunol **170**(8): 4102-10.

Dautu, G., B. Munyaka, et al. (2007). "Toxoplasma gondii: DNA vaccination with genes encoding antigens MIC2, M2AP, AMA1 and BAG1 and evaluation of their immunogenic potential." Exp Parasitol **116**(3): 273-82.

Debard, N., D. Buzoni-Gatel, et al. (1996). "Intranasal immunization with SAG1 protein of Toxoplasma gondii in association with cholera toxin dramatically reduces development of cerebral cysts after oral infection." Infect Immun **64**(6): 2158-66.

Debierre-Grockiego, F., N. Azzouz, et al. (2003). "Roles of glycosylphosphatidylinositols of Toxoplasma gondii. Induction of tumor necrosis factor-alpha production in macrophages." J Biol Chem **278**(35): 32987-93.

Debierre-Grockiego, F., M. A. Campos, et al. (2007). "Activation of TLR2 and TLR4 by glycosylphosphatidylinositols derived from Toxoplasma gondii." J Immunol **179**(2): 1129-37.

Decoster, A., F. Darcy, et al. (1988). "Recognition of Toxoplasma gondii excreted and secreted antigens by human sera from acquired and congenital toxoplasmosis: identification of markers of acute and chronic infection." Clin Exp Immunol **73**(3): 376-82.

Defrance, T., B. Vanbervliet, et al. (1992). "Interleukin 10 and transforming growth factor beta cooperate to induce anti-CD40-activated naive human B cells to secrete immunoglobulin A." J Exp Med **175**(3): 671-82.

Del Bono, V., A. Canessa, et al. (1989). "Significance of specific immunoglobulin M in the chronological diagnosis of 38 cases of toxoplasmic lymphadenopathy." J Clin Microbiol **27**(9): 2133-5.

Del Rio, L., S. Bennouna, et al. (2001). "CXCR2 deficiency confers impaired neutrophil recruitment and increased susceptibility during Toxoplasma gondii infection." J Immunol **167**(11): 6503-9.

Del Rio, L., B. A. Butcher, et al. (2004). "Toxoplasma gondii triggers myeloid differentiation factor 88-dependent IL-12 and chemokine ligand 2 (monocyte chemoattractant protein 1) responses using distinct parasite molecules and host receptors." J Immunol **172**(11): 6954-60.

Delbac, F., A. Sanger, et al. (2001). "Toxoplasma gondii myosins B/C: one gene, two tails, two localizations, and a role in parasite division." J Cell Biol **155**(4): 613-23.

Denkers, E. Y. (2003). "From cells to signaling cascades: manipulation of innate immunity by Toxoplasma gondii." FEMS Immunol Med Microbiol **39**(3): 193-203.

Denkers, E. Y. and R. T. Gazzinelli (1998). "Regulation and function of T-cell-mediated immunity during Toxoplasma gondii infection." Clin Microbiol Rev **11**(4): 569-88.

Denkers, E. Y., R. T. Gazzinelli, et al. (1993). "Bone marrow macrophages process exogenous Toxoplasma gondii polypeptides for recognition by parasite-specific cytolytic T lymphocytes." J Immunol **150**(2): 517-26.

Derouin, F., G. Sulcebe, et al. (1987). "Sequential determination of IgG subclasses and IgA specific antibodies in primary and reactivating toxoplasmosis." Biomed Pharmacother **41**(8): 429-33.

Desmonts, G. (1986). "[Immunity and toxoplasmosis in pregnant women in France]." Arch Fr Pediatr **43**(5): 367.

Desmonts, G., J. Couvreur, et al. (1965). "[Epidemiological study on toxoplasmosis: the influence of cooking slaughter-animal meat on the incidence of human infection]." Rev Fr Etud Clin Biol **10**(9): 952-8.

Desolme, B., M. N. Mevelec, et al. (2000). "Induction of protective immunity against toxoplasmosis in mice by DNA immunization with a plasmid encoding Toxoplasma gondii GRA4 gene." Vaccine **18**(23): 2512-21.

Dimier, I. H. and D. T. Bout (1998). "Interferon-gamma-activated primary enterocytes inhibit Toxoplasma gondii replication: a role for intracellular iron." Immunology **94**(4): 488-95.

Dobbin, C. A., N. C. Smith, et al. (2002). "Heat shock protein 70 is a potential virulence factor in murine toxoplasma infection via immunomodulation of host NF-kappa B and nitric oxide." J Immunol **169**(2): 958-65.

Dobrowolski, J. and L. D. Sibley (1997). "The role of the cytoskeleton in host cell invasion by Toxoplasma gondii." Behring Inst Mitt(99): 90-6.

Dobrowolski, J. M., V. B. Carruthers, et al. (1997). "Participation of myosin in gliding motility and host cell invasion by Toxoplasma gondii." Mol Microbiol **26**(1): 163-73.

Dobrowolski, J. M., V. B. Carruthers, et al. (1997). "Participation of myosin in gliding motility and host cell invasion by Toxoplasma gondii." **26**(1): 163-173.

Dobrowolski, J. M., I. R. Niesman, et al. (1997). "Actin in the parasite Toxoplasma gondii is encoded by a single copy gene, ACT1 and exists primarily in a globular form." Cell Motil Cytoskeleton **37**(3): 253-62.

Donnelly, J. J., M. A. Liu, et al. (2000). "Antigen presentation and DNA vaccines." Am J Respir Crit Care Med **162**(4 Pt 2): S190-3.

Drew, D. R., M. Lightowlers, et al. (2000). "Humoral immune responses to DNA vaccines expressing secreted, membrane bound and non-secreted forms of the Tania ovis 45W antigen." Vaccine **18**(23): 2522-32.

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." J Eukaryot Microbiol **44**(6): 592-602.

Dubey, J. P. (1998). "Advances in the life cycle of Toxoplasma gondii." Int J Parasitol **28**(7): 1019-24.

Dubey, J. P. and J. K. Frenkel (1972). "Cyst-induced toxoplasmosis in cats." J Protozool **19**(1): 155-77.

Dubey, J. P., D. H. Graham, et al. (2002). "Biological and genetic characterisation of Toxoplasma gondii isolates from chickens (Gallus domesticus) from Sao Paulo, Brazil: unexpected findings." Int J Parasitol **32**(1): 99-105.

Dubey, J. P. and J. L. Jones (2008). "Toxoplasma gondii infection in humans and animals in the United States." Int J Parasitol **38**(11): 1257-78.

Dubey, J. P. and D. S. Lindsay (2006). "Neosporosis, toxoplasmosis, and sarcocystosis in ruminants." Vet Clin North Am Food Anim Pract **22**(3): 645-71.

Dubey, J. P., D. S. Lindsay, et al. (1998). "Structures of Toxoplasma gondii tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts." Clin Microbiol Rev **11**(2): 267-99.

Dubremetz, J. F., A. Achbarou, et al. (1993). "Kinetics and Pattern of Organelle Exocytosis During Toxoplasma-Gondii/Host-Cell Interaction." **79**(5): 402-408.

Dubremetz, J. F. and E. Ferreira (1978). "Capping of cationized ferritin by coccidian zoites."

Dubremetz, J. F., N. Garcia-Reguet, et al. (1998). "Apical organelles and host-cell invasion by Apicomplexa." Int J Parasitol **28**(7): 1007-13.

Dumetre, A., D. Ajzenberg, et al. (2006). "Toxoplasma gondii infection in sheep from Haute-Vienne, France: seroprevalence and isolate genotyping by microsatellite analysis." Vet Parasitol **142**(3-4): 376-9.

Dunn, D., M. Wallon, et al. (1999). "Mother-to-child transmission of toxoplasmosis: risk estimates for clinical counselling." Lancet **353**(9167): 1829-33.

Dzierszinski, F., M. Mortuaire, et al. (2000). "Targeted disruption of the glycosylphosphatidylinositol-anchored surface antigen SAG3 gene in Toxoplasma gondii decreases host cell adhesion and drastically reduces virulence in mice." Mol Microbiol **37**(3): 574-82.

Dzierszinski, F., M. Pepper, et al. (2007). "Presentation of Toxoplasma gondii antigens via the endogenous major histocompatibility complex class I pathway in nonprofessional and professional antigen-presenting cells." Infect Immun **75**(11): 5200-9.

El Hajj, H., M. Lebrun, et al. (2007). "ROP18 is a rhoptry kinase controlling the intracellular proliferation of Toxoplasma gondii." PLoS Pathog **3**(2): e14.

Ely, K. H., L. H. Kasper, et al. (1999). "Augmentation of the CD8+ T cell response by IFN-gamma in IL-12-deficient mice during Toxoplasma gondii infection." J Immunol **162**(9): 5449-54.

Essakalli, M., O. Atouf, et al. (2008). "[Toll-like receptors.]." Pathol Biol (Paris).

Fadul, C. E., J. Y. Channon, et al. (1995). "Survival of immunoglobulin G-opsonized Toxoplasma gondii in nonadherent human monocytes." Infect Immun **63**(11): 4290-4.

Fatoohi, A. F., G. J. Cozon, et al. (2002). "Cellular immune responses to recombinant antigens in pregnant women chronically infected with Toxoplasma gondii." Clin Diagn Lab Immunol **9**(3): 704-7.

Ferreira Ade, M., R. W. Vitor, et al. (2006). "Genetic analysis of natural recombinant Brazilian Toxoplasma gondii strains by multilocus PCR-RFLP." Infect Genet Evol **6**(1): 22-31.

Ferreira, D. M., E. N. Miyaji, et al. (2006). "DNA vaccines expressing pneumococcal surface protein A (PspA) elicit protection levels comparable to recombinant protein." J Med Microbiol **55**(Pt 4): 375-8.

Fichorova, R. N., A. O. Cronin, et al. (2002). "Response to Neisseria gonorrhoeae by cervicovaginal epithelial cells occurs in the absence of toll-like receptor 4-mediated signaling." J Immunol **168**(5): 2424-32.

Flegr, J., J. Havlicek, et al. (2002). "Increased risk of traffic accidents in subjects with latent toxoplasmosis: a retrospective case-control study." BMC Infect Dis **2**: 11.

Flegr, J., P. Kodym, et al. (2000). "Correlation of duration of latent Toxoplasma gondii infection with personality changes in women." Biol Psychol **53**(1): 57-68.

Flegr, J., M. Preiss, et al. (2003). "Decreased level of psychobiological factor novelty seeking and lower intelligence in men latently infected with the protozoan parasite Toxoplasma gondii Dopamine, a missing link between schizophrenia and toxoplasmosis?" Biol Psychol **63**(3): 253-68.

Foudrinier, F., I. Villena, et al. (2003). "Clinical value of specific immunoglobulin E detection by enzyme-linked immunosorbent assay in cases of acquired and congenital toxoplasmosis." J Clin Microbiol **41**(4): 1681-6.

Fox, B. A., J. P. Gigley, et al. (2004). "Toxoplasma gondii lacks the enzymes required for de novo arginine biosynthesis and arginine starvation triggers cyst formation." Int J Parasitol **34**(3): 323-31.

French, A. R., E. B. Holroyd, et al. (2006). "IL-18 acts synergistically with IL-15 in stimulating natural killer cell proliferation." Cytokine **35**(5-6): 229-34.

Frenkel, J. K., J. P. Dubey, et al. (1969). "Toxoplasma gondii: fecal forms separated from eggs of the nematode Toxocara cati." Science **164**(878): 432-3.

Frenkel, J. K., J. P. Dubey, et al. (1970). "Toxoplasma gondii in cats: fecal stages identified as coccidian oocysts." Science **167**(3919): 893-6.

Frenkel, J. K., E. R. Pfefferkorn, et al. (1991). "Prospective vaccine prepared from a new mutant of Toxoplasma gondii for use in cats." Am J Vet Res **52**(5): 759-63.

Frickel, E. M., N. Sahoo, et al. (2008). "Parasite Stage-Specific Recognition of Endogenous Toxoplasma gondii-Derived CD8(+) T Cell Epitopes." J Infect Dis.

Fu, T. M., J. B. Ulmer, et al. (1997). "Priming of cytotoxic T lymphocytes by DNA vaccines: requirement for professional antigen presenting cells and evidence for antigen transfer from myocytes." Mol Med **3**(6): 362-71.

Fuentes, I., J. M. Rubio, et al. (2001). "Genotypic characterization of Toxoplasma gondii strains associated with human toxoplasmosis in Spain: direct analysis from clinical samples." J Clin Microbiol **39**(4): 1566-70.

Fuller, D. H. and J. R. Haynes (1994). "A qualitative progression in HIV type 1 glycoprotein 120-specific cytotoxic cellular and humoral immune responses in mice receiving a DNA-based glycoprotein 120 vaccine." AIDS Res Hum Retroviruses **10**(11): 1433-41.

Gahery-Segard, H., G. Pialoux, et al. (2000). "Multiepitopic B- and T-cell responses induced in humans by a human immunodeficiency virus type 1 lipopeptide vaccine." J Virol **74**(4): 1694-703.

Gail, M., U. Gross, et al. (2004). "Transferrin receptor induction in Toxoplasma gondii-infected HFF is associated with increased iron-responsive protein 1 activity and is mediated by secreted factors." Parasitol Res **94**(3): 233-9.

Gallego, C., C. Saavedra-Matiz, et al. (2006). "Direct genotyping of animal and human isolates of Toxoplasma gondii from Colombia (South America)." Acta Trop **97**(2): 161-7.

Garcia-Reguet, N., M. Lebrun, et al. (2000). "The microneme protein MIC3 of Toxoplasma gondii is a secretory adhesin that binds to both the surface of the host cells and the surface of the parasite." Cell Microbiol **2**(4): 353-64.

Garweg, J. G., S. D. Garweg, et al. (2004). "Aqueous humor and serum immunoblotting for immunoglobulin types G, A, M, and E in cases of human ocular toxoplasmosis." J Clin Microbiol **42**(10): 4593-8.

Gatkowska, J., E. Hiszczynska-Sawicka, et al. (2006). "Toxoplasma gondii: an evaluation of diagnostic value of recombinant antigens in a murine model." Exp Parasitol **114**(3): 220-7.

Gay-Andrieu, F., P. Marty, et al. (2003). "Fetal toxoplasmosis and negative amniocentesis: necessity of an ultrasound follow-up." Prenat Diagn **23**(7): 558-60.

Gazzinelli, R., Y. Xu, et al. (1992). "Simultaneous depletion of CD4+ and CD8+ T lymphocytes is required to reactivate chronic infection with Toxoplasma gondii." J Immunol **149**(1): 175-80.

Gazzinelli, R. T., F. T. Hakim, et al. (1991). "Synergistic role of CD4+ and CD8+ T lymphocytes in IFN-gamma production and protective immunity induced by an attenuated Toxoplasma gondii vaccine." J Immunol **146**(1): 286-92.

Gazzinelli, R. T., S. Hieny, et al. (1993). "Interleukin 12 is required for the T-lymphocyte-independent induction of interferon gamma by an intracellular parasite and induces resistance in T-cell-deficient hosts." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(13): 6115-9.

Gazzinelli, R. T., M. Wysocka, et al. (1994). "Parasite-induced IL-12 stimulates early IFN-gamma synthesis and resistance during acute infection with Toxoplasma gondii." J Immunol **153**(6): 2533-43.

Gazzinelli, R. T., M. Wysocka, et al. (1996). "In the absence of endogenous IL-10, mice acutely infected with Toxoplasma gondii succumb to a lethal immune response dependent on CD4+ T cells and accompanied by overproduction of IL-12, IFN-gamma and TNF-alpha." J Immunol **157**(2): 798-805.

Gordon, J. N., A. Di Sabatino, et al. (2005). "The pathophysiologic rationale for biological therapies in inflammatory bowel disease." Curr Opin Gastroenterol **21**(4): 431-7.

Gorgievski-Hrisoho, M., D. Germann, et al. (1996). "Diagnostic implications of kinetics of immunoglobulin M and A antibody responses to Toxoplasma gondii." J Clin Microbiol **34**(6): 1506-11.

Gowen, B. B., D. F. Smee, et al. (2006). "Recombinant Eimeria protozoan protein elicits resistance to acute phlebovirus infection in mice but not hamsters." Antimicrob Agents Chemother **50**(6): 2023-9.

Gray, F., R. Gherardi, et al. (1989). "Diffuse "encephalitic" cerebral toxoplasmosis in AIDS. Report of four cases." J Neurol **236**(5): 273-7.

Greig, A., D. Buxton, et al. (1993). "Diagnosis of toxoplasma abortion in sheep." Vet Rec **132**(9): 226-7.

Grimwood, J. and J. E. Smith (1996). "Toxoplasma gondii: the role of parasite surface and secreted proteins in host cell invasion." Int J Parasitol **26**(2): 169-73.

Guan, H., M. Moretto, et al. (2007). "NK cells enhance dendritic cell response against parasite antigens via NKG2D pathway." J Immunol **179**(1): 590-6.

Guermonprez, P., L. Saveanu, et al. (2003). "ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells." Nature **425**(6956): 397-402.

Hakansson, S., H. Morisaki, et al. (1999). "Time-lapse video microscopy of gliding motility in Toxoplasma gondii reveals a novel, biphasic mechanism of cell locomotion." Mol Biol Cell **10**(11): 3539-47.

Halonen, S. K., G. A. Taylor, et al. (2001). "Gamma interferon-induced inhibition of Toxoplasma gondii in astrocytes is mediated by IGTP." Infect Immun **69**(9): 5573-6.

Halperin, S. A., S. Dobson, et al. (2006). "Comparison of the safety and immunogenicity of hepatitis B virus surface antigen co-administered with an immunostimulatory phosphorothioate oligonucleotide and a licensed hepatitis B vaccine in healthy young adults." Vaccine **24**(1): 20-6.

Harding, C. V., R. Song, et al. (1995). "Processing of bacterial antigens for presentation to class I and II MHC-restricted T lymphocytes." Infect Agents Dis **4**(1): 1-12.

Harper, D. M., E. L. Franco, et al. (2004). "Efficacy of a bivalent L1 virus-like particle vaccine in prevention of infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: a randomised controlled trial." Lancet **364**(9447): 1757-65.

Harris, D. P., L. Haynes, et al. (2000). "Reciprocal regulation of polarized cytokine production by effector B and T cells." Nat Immunol **1**(6): 475-82.

Haugwitz, M., A. A. Noegel, et al. (1991). "Dictyostelium discoideum contains two profilin isoforms that differ in structure and function." J Cell Sci **100 (Pt 3)**: 481-9.

Hauser, W. E., Jr. and J. S. Remington (1981). "Effect of monoclonal antibodies on phagocytosis and killing of Toxoplasma gondii by normal macrophages." Infect Immun **32**(2): 637-40.

Havlicek, J., Z. G. Gasova, et al. (2001). "Decrease of psychomotor performance in subjects with latent 'asymptomatic' toxoplasmosis." Parasitology **122**(Pt 5): 515-20.

Hayashi, F., K. D. Smith, et al. (2001). "The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5." Nature **410**(6832): 1099-103.

He, C. Y., M. K. Shaw, et al. (2001). "A plastid segregation defect in the protozoan parasite Toxoplasma gondii." Embo J **20**(3): 330-339.

He, X. L., M. E. Grigg, et al. (2002). "Structure of the immunodominant surface antigen from the Toxoplasma gondii SRS superfamily." Nat Struct Biol **1**: 1.

Hemmi, H., T. Kaisho, et al. (2002). "Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway." Nat Immunol **3**(2): 196-200.

Hennecke, M., M. Kwissa, et al. (2001). "Composition and arrangement of genes define the strength of IRES-driven translation in bicistronic mRNAs." Nucleic Acids Res **29**(16): 3327-34.

Henricson, B. E., C. L. Manthey, et al. (1993). "Dissociation of lipopolysaccharide (LPS)-inducible gene expression in murine macrophages pretreated with smooth LPS versus monophosphoryl lipid A." Infect Immun **61**(6): 2325-33.

Hitziger, N., I. Dellacasa, et al. (2005). "Dissemination of Toxoplasma gondii to immunoprivileged organs and role of Toll/interleukin-1 receptor signalling for host resistance assessed by in vivo bioluminescence imaging." Cell Microbiol **7**(6): 837-48.

Holland, G. N. (2003). "Ocular toxoplasmosis: a global reassessment. Part I: epidemiology and course of disease." Am J Ophthalmol **136**(6): 973-88.

Holland, G. N. (2004). "Ocular toxoplasmosis: a global reassessment. Part II: disease manifestations and management." Am J Ophthalmol **137**(1): 1-17.

Honore, S., A. Couvelard, et al. (2000). "[Genotyping of Toxoplasma gondii strains from immunocompromised patients]." Pathol Biol (Paris) **48**(6): 541-7.

Howe, D. K. and L. D. Sibley (1995). "Toxoplasma gondii comprises three clonal lineages: Correlation of parasite genotype with human disease." **172**(6): 1561-1566.

Hunter, C. A., J. S. Abrams, et al. (1993). "Cytokine mRNA in the central nervous system of SCID mice infected with Toxoplasma gondii: importance of T-cell-independent regulation of resistance to T. gondii." Infect Immun **61**(10): 4038-44.

Hunter, C. A., L. Bermudez, et al. (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." Eur J Immunol **25**(4): 994-1000.

Hunter, C. A., E. Candolfi, et al. (1995). "Studies on the role of interleukin-12 in acute murine toxoplasmosis." Immunology **84**(1): 16-20.

Hunter, C. A., R. Chizzonite, et al. (1995). "IL-1 beta is required for IL-12 to induce production of IFN-gamma by NK cells. A role for IL-1 beta in the T cell-independent mechanism of resistance against intracellular pathogens." J Immunol **155**(9): 4347-54.

Hunter, C. A., L. Ellis-Neyer, et al. (1997). "The role of the CD28/B7 interaction in the regulation of NK cell responses during infection with Toxoplasma gondii." J Immunol **158**(5): 2285-93.

Hunter, C. A., C. S. Subauste, et al. (1994). "Production of gamma interferon by natural killer cells from Toxoplasma gondii-infected SCID mice: regulation by interleukin-10, interleukin-12, and tumor necrosis factor alpha." Infect Immun **62**(7): 2818-24.

Huskinson, J., P. N. Stepick-Biek, et al. (1989). "Toxoplasma antigens recognized by immunoglobulin G subclasses during acute and chronic infection." J Clin Microbiol **27**(9): 2031-8.

Hutchison, W. M. (1965). "Experimental transmission of Toxoplasma gondii." Nature **206**(987): 961-2.

Huynh, M. H. and V. B. Carruthers (2006). "Toxoplasma MIC2 is a major determinant of invasion and virulence." PLoS Pathog **2**(8): e84.

Huynh, M. H., C. Opitz, et al. (2004). "Trans-genera reconstitution and complementation of an adhesion complex in Toxoplasma gondii." Cell Microbiol **6**(8): 771-82.

Ichinohe, T., S. Tamura, et al. (2007). "Cross-protection against H5N1 influenza virus infection is afforded by intranasal inoculation with seasonal trivalent inactivated influenza vaccine." J Infect Dis **196**(9): 1313-20.

Igarashi, M., F. Kano, et al. (2008). "Toxoplasma gondii: evaluation of an intranasal vaccine using recombinant proteins against brain cyst formation in BALB/c mice." Exp Parasitol **118**(3): 386-92.

Inchauspe, G., L. Vitvitski, et al. (1997). "Plasmid DNA expressing a secreted or a nonsecreted form of hepatitis C virus nucleocapsid: comparative studies of antibody and T-helper responses following genetic immunization." DNA Cell Biol **16**(2): 185-95.

Ishii, K., H. Hisaeda, et al. (2006). "The involvement of immunoproteasomes in induction of MHC class I-restricted immunity targeting Toxoplasma SAG1." Microbes Infect **8**(4): 1045-53.

Ismael, A. B., I. Dimier-Poisson, et al. (2006). "Mic1-3 knockout of Toxoplasma gondii is a successful vaccine against chronic and congenital toxoplasmosis in mice." J Infect Dis **194**(8): 1176-83.

Ismael, A. B., D. Sekkai, et al. (2003). "The MIC3 gene of Toxoplasma gondii is a novel potent vaccine candidate against toxoplasmosis." Infect Immun **71**(11): 6222-8.

Israelski, D. M. and J. S. Remington (1993). "Toxoplasmosis in the non-AIDS immunocompromised host." Curr Clin Top Infect Dis **13**: 322-56.

Iwasaki, A., C. A. Torres, et al. (1997). "The dominant role of bone marrow-derived cells in CTL induction following plasmid DNA immunization at different sites." J Immunol **159**(1): 11-4.

Jacobs, D., J. F. Dubremetz, et al. (1998). "Identification and heterologous expression of a new dense granule protein (GRA7) from Toxoplasma gondii." Mol Biochem Parasitol **91**(2): 237-49.

Jarrossay, D., G. Napolitani, et al. (2001). "Specialization and complementarity in microbial molecule recognition by human myeloid and plasmacytoid dendritic cells." Eur J Immunol **31**(11): 3388-93.

Jockusch, B. M., K. Murk, et al. (2007). "The profile of profilins." Rev Physiol Biochem Pharmacol **159**: 131-49.

Johnson, A. M., P. J. McDonald, et al. (1983). "Monoclonal antibodies to Toxoplasma cell membrane surface antigens protect mice from toxoplasmosis." J Protozool **30**(2): 351-6.

Johnson, L. L., P. Lanthier, et al. (2004). "Vaccination protects B cell-deficient mice against an oral challenge with mildly virulent Toxoplasma gondii." Vaccine **22**(29-30): 4054-61.

Jones, T. C., S. Yeh, et al. (1972). "The interaction between Toxoplasma gondii and mammalian cells."

Jongert, E., D. Verhelst, et al. (2008). "Protective Th1 immune responses against chronic toxoplasmosis induced by a protein-protein vaccine combination but not by its DNA-protein counterpart." Vaccine **26**(41): 5289-95.

Julander, J. G., J. W. Judge, et al. (2007). "Prophylactic treatment with recombinant Eimeria protein, alone or in combination with an agonist cocktail, protects mice from Banzi virus infection." Antiviral Res **75**(1): 14-9.

Kadowaki, N., S. Ho, et al. (2001). "Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens." J Exp Med **194**(6): 863-9.

Kang, H., J. S. Remington, et al. (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." J Immunol **164**(5): 2629-34.

Kang, K. M., G. S. Lee, et al. (2004). "Effects of iNOS inhibitor on IFN-gamma production and apoptosis of splenocytes in genetically different strains of mice infected with Toxoplasma gondii." Korean J Parasitol **42**(4): 175-83.

Kanzler, H., F. J. Barrat, et al. (2007). "Therapeutic targeting of innate immunity with Toll-like receptor agonists and antagonists." Nat Med **13**(5): 552-9.

Kasper, L. H., K. M. Currie, et al. (1985). "An unexpected response to vaccination with a purified major membrane tachyzoite antigen (P30) of Toxoplasma gondii." J Immunol **134**(5): 3426-31.

Keeley, A. and D. Soldati (2004). "The glideosome: a molecular machine powering motility and host-cell invasion by Apicomplexa." Trends Cell Biol **14**(10): 528-32.

Kelly, M. N., J. K. Kolls, et al. (2005). "Interleukin-17/interleukin-17 receptor-mediated signaling is important for generation of an optimal polymorphonuclear response against Toxoplasma gondii infection." Infect Immun **73**(1): 617-21.

Kessler, H., A. Herm-Gotz, et al. (2008). "Microneme protein 8--a new essential invasion factor in Toxoplasma gondii." J Cell Sci **121**(Pt 7): 947-56.

Khan, A., B. Fux, et al. (2007). "Recent transcontinental sweep of Toxoplasma gondii driven by a single monomorphic chromosome." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(37): 14872-7.

Khan, I. A., M. E. Eckel, et al. (1988). "Production of gamma interferon by cultured human lymphocytes stimulated with a purified membrane protein (P30) from Toxoplasma gondii." J Infect Dis **157**(5): 979-84.

Khan, I. A., K. H. Ely, et al. (1994). "Antigen-specific CD8+ T cell clone protects against acute Toxoplasma gondii infection in mice." J Immunol **152**(4): 1856-60.

Khan, I. A., J. D. Schwartzman, et al. (1997). "A dichotomous role for nitric oxide during acute Toxoplasma gondii infection in mice." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(25): 13955-60.

Kim, L., B. A. Butcher, et al. (2006). "Toxoplasma gondii genotype determines MyD88-dependent signaling in infected macrophages." J Immunol **177**(4): 2584-91.

Kim, S. K., G. Ragupathi, et al. (1999). "Comparison of the effect of different immunological adjuvants on the antibody and T-cell response to immunization with MUC1-KLH and GD3-KLH conjugate cancer vaccines." Vaccine **18**(7-8): 597-603.

Kleine-Tebbe, J. and D. A. Herold (2003). "[Cross-reactive allergen clusters in pollen-associated food allergy]." Hautarzt **54**(2): 130-7.

Korbel, D. S., O. C. Finney, et al. (2004). "Natural killer cells and innate immunity to protozoan pathogens." Int J Parasitol **34**(13-14): 1517-28.

Krieg, A. M. (2006). "Therapeutic potential of Toll-like receptor 9 activation." Nat Rev Drug Discov **5**(6): 471-84.

Krieg, A. M. (2007). "Development of TLR9 agonists for cancer therapy." J Clin Invest **117**(5): 1184-94.

Krieg, A. M., A. K. Yi, et al. (1995). "CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation." Nature **374**(6522): 546-9.

Krishnan, J., K. Selvarajoo, et al. (2007). "Toll-like receptor signal transduction." Exp Mol Med **39**(4): 421-38.

Kuo, I. and N. A. Rao (1999). "Ocular disease in AIDS." Springer Semin Immunopathol **21**(2): 161-77.

Kurt-Jones, E. A., L. Popova, et al. (2000). "Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus." Nat Immunol **1**(5): 398-401.

Kwok, L. Y., S. Lutjen, et al. (2003). "The induction and kinetics of antigen-specific CD8 T cells are defined by the stage specificity and compartmentalization of the antigen in murine toxoplasmosis." J Immunol **170**(4): 1949-57.

Lee, B. W., R. S. Geha, et al. (1988). "IgE response and its regulation in allergic diseases." Pediatr Clin North Am **35**(5): 953-67.

Lillehoj, H. S., K. D. Choi, et al. (2000). "A recombinant Eimeria protein inducing interferon-gamma production: comparison of different gene expression systems and immunization strategies for vaccination against coccidiosis." Avian Dis **44**(2): 379-89.

Labruyere, E., M. Lingnau, et al. (1999). "Differential membrane targeting of the secretory proteins GRA4 and GRA6 within the parasitophorous vacuole formed by Toxoplasma gondii." Mol Biochem Parasitol **102**(2): 311-24.

Laliberte, J. and V. B. Carruthers (2008). "Host cell manipulation by the human pathogen Toxoplasma gondii." Cell Mol Life Sci **65**(12): 1900-15.

Lambert, H., N. Hitziger, et al. (2006). "Induction of dendritic cell migration upon Toxoplasma gondii infection potentiates parasite dissemination." Cell Microbiol **8**(10): 1611-23.

Langermans, J. A., M. E. van der Hulst, et al. (1992). "Endogenous tumor necrosis factor alpha is required for enhanced antimicrobial activity against Toxoplasma gondii and Listeria monocytogenes in recombinant gamma interferon-treated mice." Infect Immun **60**(12): 5107-12.

Lappin, M. R., D. P. Burney, et al. (1995). "Detection of Toxoplasma gondii-specific IgA in the aqueous humor of cats." Am J Vet Res **56**(6): 774-8.

Lebrun, M., A. Michelin, et al. (2005). "The rhoptry neck protein RON4 re-localizes at the moving junction during Toxoplasma gondii invasion." Cell Microbiol **7**(12): 1823-33.

Lecordier, L., C. Mercier, et al. (1999). "Transmembrane insertion of the Toxoplasma gondii GRA5 protein occurs after soluble secretion into the host cell." Mol Biol Cell **10**(4): 1277-87.

Lee, B. W., R. S. Geha, et al. (1988). "IgE response and its regulation in allergic diseases." Pediatr Clin North Am **35**(5): 953-67.

Lee, S. W., J. H. Cho, et al. (1998). "Optimal induction of hepatitis C virus envelope-specific immunity by bicistronic plasmid DNA inoculation with the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene." J Virol **72**(10): 8430-6.

Lehmann, M. J. and G. Sczakiel (2005). "Spontaneous uptake of biologically active recombinant DNA by mammalian cells via a selected DNA segment." Gene Ther **12**(5): 446-51.

Lekutis, C., D. J. Ferguson, et al. (2000). "Toxoplasma gondii: identification of a developmentally regulated family of genes related to SAG2 [In Process Citation]." Exp Parasitol **96**(2): 89-96.

Lekutis, C., D. J. Ferguson, et al. (2001). "Surface antigens of Toxoplasma gondii: variations on a theme." Int J Parasitol **31**(12): 1285-92.

Lepage, A. C., D. Buzoni-Gatel, et al. (1998). "Gut-derived intraepithelial lymphocytes induce long term immunity against Toxoplasma gondii." J Immunol **161**(9): 4902-8.

Leport, C. and J. S. Remington (1992). "[Toxoplasmosis in AIDS]." Presse Med **21**(25): 1165-71.

Letscher-Bru, V., O. Villard, et al. (1998). "Protective effect of vaccination with a combination of recombinant surface antigen 1 and interleukin-12 against toxoplasmosis in mice." Infect Immun **66**(9): 4503-6.

Levy, M. Y., L. G. Barron, et al. (1996). "Characterization of plasmid DNA transfer into mouse skeletal muscle: evaluation of uptake mechanism, expression and secretion of gene products into blood." Gene Ther **3**(3): 201-11.

Lieberman, L. A. and C. A. Hunter (2002). "The role of cytokines and their signaling pathways in the regulation of immunity to Toxoplasma gondii." Int Rev Immunol **21**(4-5): 373-403.

Liesenfeld, O. (1999). "Immune responses to Toxoplasma gondii in the gut." Immunobiology **201**(2): 229-39.

Liesenfeld, O., J. Kosek, et al. (1996). "Association of CD4+ T cell-dependent, interferon-gamma-mediated necrosis of the small intestine with genetic susceptibility of mice to peroral infection with Toxoplasma gondii." J Exp Med **184**(2): 597-607.

Lillehoj, H. S., K. D. Choi, et al. (2000). "A recombinant Eimeria protein inducing interferon-gamma production: comparison of different gene expression systems and immunization strategies for vaccination against coccidiosis." Avian Dis **44**(2): 379-89.

Lindberg, R. E. and J. K. Frenkel (1977). "Toxoplasmosis in nude mice." J Parasitol **63**(2): 219-21.

Lingnau, K., K. Riedl, et al. (2007). "IC31 and IC30, novel types of vaccine adjuvant based on peptide delivery systems." Expert Rev Vaccines **6**(5): 741-6.

Liu, C. H., Y. T. Fan, et al. (2006). "Cutting edge: dendritic cells are essential for in vivo IL-12 production and development of resistance against Toxoplasma gondii infection in mice." J Immunol **177**(1): 31-5.

Liu, L. Y., C. A. Swenson, et al. (2003). "Comparison of the effects of repetitive low-dose and single-dose antigen challenge on airway inflammation." J Allergy Clin Immunol **111**(4): 818-25.

Liu, M. A. and J. B. Ulmer (2000). "Gene-based vaccines." Mol Ther **1**(6): 497-500.

Luangsay, S., L. H. Kasper, et al. (2003). "CCR5 mediates specific migration of Toxoplasma gondii-primed CD8 lymphocytes to inflammatory intestinal epithelial cells." Gastroenterology **125**(2): 491-500.

Luder, C. G., U. Gross, et al. (2001). "Intracellular protozoan parasites and apoptosis: diverse strategies to modulate parasite-host interactions." Trends Parasitol **17**(10): 480-6.

Luder, C. G., C. Lang, et al. (2003). "Toxoplasma gondii inhibits MHC class II expression in neural antigen-presenting cells by down-regulating the class II transactivator CIITA." J Neuroimmunol **134**(1-2): 12-24.

Luder, C. G., T. Lang, et al. (1998). "Down-regulation of MHC class II molecules and inability to up-regulate class I molecules in murine macrophages after infection with Toxoplasma gondii." Clin Exp Immunol **112**(2): 308-16.

Luft, B. J., R. G. Brooks, et al. (1984). "Toxoplasmic encephalitis in patients with acquired immune deficiency syndrome." Jama **252**(7): 913-7.

Luft, B. J., R. Hafner, et al. (1993). "Toxoplasmic encephalitis in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. Members of the ACTG 077p/ANRS 009 Study Team." N Engl J Med **329**(14): 995-1000.

Luft, B. J., G. Kansas, et al. (1984). "Functional and quantitative alterations in T lymphocyte subpopulations in acute toxoplasmosis." J Infect Dis **150**(5): 761-7.

Luft, B. J., Y. Naot, et al. (1983). "Primary and reactivated toxoplasma infection in patients with cardiac transplants. Clinical spectrum and problems in diagnosis in a defined population." Ann Intern Med **99**(1): 27-31.

Luo, S., M. Vieira, et al. (2001). "A plasma membrane-type Ca(2+)-ATPase co-localizes with a vacuolar H(+)-pyrophosphatase to acidocalcisomes of Toxoplasma gondii." Embo J **20**(1-2): 55-64.

Lutjen, S., S. Soltek, et al. (2006). "Organ- and disease-stage-specific regulation of Toxoplasma gondii-specific CD8-T-cell responses by CD4 T cells." Infect Immun **74**(10): 5790-801.

Ma, R., J. L. Du, et al. (2007). "Additive effects of CpG ODN and R-848 as adjuvants on augmenting immune responses to HBsAg vaccination." Biochem Biophys Res Commun **361**(2): 537-42.

Mack, D. G. and R. McLeod (1992). "Human Toxoplasma gondii-specific secretory immunoglobulin A reduces T. gondii infection of enterocytes in vitro." J Clin Invest **90**(6): 2585-92.

Manger, I. D., A. B. Hehl, et al. (1998). "The surface of Toxoplasma tachyzoites is dominated by a family of glycosylphosphatidylinositol-anchored antigens related to SAG1." Infect Immun **66**(5): 2237-44.

Marechal, E. and M. F. Cesbron-Delauw (2001). "The apicoplast: a new member of the plastid family." Trends Plant Sci **6**(5): 200-5.

Marshak-Rothstein, A. (2006). "Toll-like receptors in systemic autoimmune disease." Nat Rev Immunol **6**(11): 823-35.

Martens, S., I. Parvanova, et al. (2005). "Disruption of Toxoplasma gondii parasitophorous vacuoles by the mouse p47-resistance GTPases." PLoS Pathog **1**(3): e24.

Martin, A. M., T. Liu, et al. (2007). "The Toxoplasma gondii parasitophorous vacuole membrane: transactions across the border." J Eukaryot Microbiol **54**(1): 25-8.

Martin, S. (2001). "Congenital toxoplasmosis." Neonatal Netw **20**(4): 23-30.

Martin, V., M. Arcavi, et al. (1998). "Detection of human Toxoplasma-specific immunoglobulins A, M, and G with a recombinant Toxoplasma gondii rop2 protein." Clin Diagn Lab Immunol **5**(5): 627-31.

Martin, V., A. Supanitsky, et al. (2004). "Recombinant GRA4 or ROP2 protein combined with alum or the gra4 gene provides partial protection in chronic murine models of toxoplasmosis." Clin Diagn Lab Immunol **11**(4): 704-10.

Martinez-Donato, G., Y. Capdesuner, et al. (2007). "Multimeric HCV E2 protein obtained from Pichia pastoris cells induces a strong immune response in mice." Mol Biotechnol **35**(3): 225-35.

Mateus-Pinilla, N. E., J. P. Dubey, et al. (1999). "A field trial of the effectiveness of a feline Toxoplasma gondii vaccine in reducing T. gondii exposure for swine." J Parasitol **85**(5): 855-60.

McCabe, R. E., R. G. Brooks, et al. (1987). "Clinical spectrum in 107 cases of toxoplasmic lymphadenopathy." Rev Infect Dis **9**(4): 754-74.

McKee, A. S., F. Dzierszinski, et al. (2004). "Functional inactivation of immature dendritic cells by the intracellular parasite Toxoplasma gondii." J Immunol **173**(4): 2632-40.

Meissner, M., M. Reiss, et al. (2002). "A family of transmembrane microneme proteins of Toxoplasma gondii contain EGF-like domains and function as escorters." J Cell Sci **115**(Pt 3): 563-74.

Meissner, M., M. Reiss, et al. (2002). "A family of transmembrane microneme proteins of Toxoplasma gondii contain EGF-like domains and function as escorters." J Cell Sci **115**(Pt 3): 563-74.

Mele, A., P. J. Paterson, et al. (2002). "Toxoplasmosis in bone marrow transplantation: a report of two cases and systematic review of the literature." Bone Marrow Transplant **29**(8): 691-8.

Menard, L. C., L. A. Minns, et al. (2007). "B cells amplify IFN-gamma production by T cells via a TNF-alpha-mediated mechanism." J Immunol **179**(7): 4857-66.

Menard, R. (2001). "Gliding motility and cell invasion by Apicomplexa: insights from the Plasmodium sporozoite." Cell Microbiol **3**(2): 63-73.

Mevelec, M. N., D. Bout, et al. (2005). "Evaluation of protective effect of DNA vaccination with genes encoding antigens GRA4 and SAG1 associated with GM-CSF plasmid, against acute, chronical and congenital toxoplasmosis in mice." Vaccine **23**(36): 4489-99.

Mevelec, M. N., T. Chardes, et al. (1992). "Molecular cloning of GRA4, a Toxoplasma gondii dense granule protein, recognized by mucosal IgA antibodies." Mol Biochem Parasitol **56**(2): 227-38.

Meyer, T. and E. Stockfleth (2008). "Clinical investigations of Toll-like receptor agonists." Expert Opin Investig Drugs **17**(7): 1051-65.

Michel, O., J. Kips, et al. (1996). "Severity of asthma is related to endotoxin in house dust." Am J Respir Crit Care Med **154**(6 Pt 1): 1641-6.

Miller, C. M., N. R. Boulter, et al. (2008). "The immunobiology of the innate response to Toxoplasma gondii." Int J Parasitol.

Mineo, J. R., I. A. Khan, et al. (1994). "Toxoplasma gondii: a monoclonal antibody that inhibits intracellular replication." Exp Parasitol **79**(3): 351-61.

Mineo, J. R., R. McLeod, et al. (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." J Immunol **150**(9): 3951-64.

Minns, L. A., L. C. Menard, et al. (2006). "TLR9 is required for the gut-associated lymphoid tissue response following oral infection of Toxoplasma gondii." J Immunol **176**(12): 7589-97.

Mishima, M., X. Xuan, et al. (2002). "Recombinant feline herpesvirus type 1 expressing Toxoplasma gondi ROP2 antigen inducible protective immunity in cats." Parasitol Res **88**(2): 144-9.

Mohamed, R. M., F. Aosai, et al. (2003). "Induction of protective immunity by DNA vaccination with Toxoplasma gondii HSP70, HSP30 and SAG1 genes." Vaccine **21**(21-22): 2852-61.

Montoya, J. G., K. E. Lowe, et al. (1996). "Human CD4+ and CD8+ T lymphocytes are both cytotoxic to Toxoplasma gondii-infected cells." Infect Immun **64**(1): 176-81.

Mordue, D. G., N. Desai, et al. (1999). "Invasion by Toxoplasma gondii Establishes a Moving Junction That Selectively Excludes Host Cell Plasma Membrane Proteins on the Basis of Their Membrane Anchoring." J Exp Med **190**(12): 1783-1792.

Mordue, D. G., S. Hakansson, et al. (1999). "Toxoplasma gondii resides in a vacuole that avoids fusion with host cell endocytic and exocytic vesicular trafficking pathways." Exp Parasitol **92**(2): 87-99.

Mordue, D. G. and L. D. Sibley (1997). "Intracellular fate of vacuoles containing Toxoplasma gondii is determined at the time of formation and depends on the mechanism of entry." J Immunol **159**(9): 4452-9.

Mordue, D. G. and L. D. Sibley (2003). "A novel population of Gr-1+-activated macrophages induced during acute toxoplasmosis." J Leukoc Biol **74**(6): 1015-25.

Moreno, S. N. J. and L. Zhong (1996). "Acidocalcisomes in Toxoplasma gondii tachyzoites." **313**: 655-659.

Morisaki, J. H., J. E. Heuser, et al. (1995). "Invasion of Toxoplasma gondii occurs by active penetration of the host cell." **108**(Part 6): 2457-2464.

Morisaki, J. H., J. E. Heuser, et al. (1995). "Invasion of Toxoplasma gondii occurs by active penetration of the host cell." J Cell Sci **108 (Pt 6)**: 2457-64.

Mouries, J., G. Moron, et al. (2008). "Plasmacytoid dendritic cells efficiently cross-prime naive T cells in vivo after TLR activation." Blood **112**(9): 3713-22.

Mun, H. S., F. Aosai, et al. (2000). "Toxoplasma gondii Hsp70 as a danger signal in toxoplasma gondii-infected mice." Cell Stress Chaperones **5**(4): 328-35.

Mun, H. S., F. Aosai, et al. (2003). "TLR2 as an essential molecule for protective immunity against Toxoplasma gondii infection." Int Immunol **15**(9): 1081-7.

Mun, H. S., F. Aosai, et al. (1999). "Role of Toxoplasma gondii HSP70 and Toxoplasma gondii HSP30/bag1 in antibody formation and prophylactic immunity in mice experimentally infected with Toxoplasma gondii." Microbiol Immunol **43**(5): 471-9.

Murray, H. W., B. Y. Rubin, et al. (1985). "Human mononuclear phagocyte antiprotozoal mechanisms: oxygen-dependent vs oxygen-independent activity against intracellular Toxoplasma gondii." J Immunol **134**(3): 1982-8.

Nakaar, V., H. M. Ngo, et al. (2003). "Pleiotropic effect due to targeted depletion of secretory rhoptry protein ROP2 in Toxoplasma gondii." J Cell Sci **116**(Pt 11): 2311-20.

Nakano, Y., H. Hisaeda, et al. (2001). "Granule-dependent killing of Toxoplasma gondii by CD8+ T cells." Immunology **104**(3): 289-98.

Nalubamba, K. S., A. G. Gossner, et al. (2007). "Differential expression of pattern recognition receptors in sheep tissues and leukocyte subsets." Vet Immunol Immunopathol **118**(3-4): 252-62.

Navia, B. A., C. K. Petito, et al. (1986). "Cerebral toxoplasmosis complicating the acquired immune deficiency syndrome: clinical and neuropathological findings in 27 patients." Ann Neurol **19**(3): 224-38.

Neyer, L. E., G. Grunig, et al. (1997). "Role of interleukin-10 in regulation of T-cell-dependent and T-cell-independent mechanisms of resistance to Toxoplasma gondii." Infect Immun **65**(5): 1675-82.

Nguyen, T. D., G. Bigaignon, et al. (2003). "Virulent Toxoplasma gondii strain RH promotes T-cell-independent overproduction of proinflammatory cytokines IL12 and gamma-interferon." J Med Microbiol **52**(Pt 10): 869-76.

Nichols, W. W., B. J. Ledwith, et al. (1995). "Potential DNA vaccine integration into host cell genome." Ann N Y Acad Sci **772**: 30-9.

Ohashi, K., V. Burkart, et al. (2000). "Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex." J Immunol **164**(2): 558-61.
Okamura, Y., M. Watari, et al. (2001). "The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4." J Biol Chem **276**(13): 10229-33.

Omata, Y., K. Terada, et al. (1997). "Positive evidence that anti-Toxoplasma gondii IgA antibody exists in the intestinal tract of infected cats and exerts protective activity against the infection." Vet Parasitol **73**(1-2): 1-11.

Omer, F. M., J. A. Kurtzhals, et al. (2000). "Maintaining the immunological balance in parasitic infections: a role for TGF-beta?" Parasitol Today **16**(1): 18-23.

Opitz, C. and D. Soldati (2002). "'The glideosome': a dynamic complex powering gliding motion and host cell invasion by Toxoplasma gondii." Mol Microbiol **45**(3): 597-604.

Ossorio, P. N., J. F. Dubremetz, et al. (1994). "A soluble secretory protein of the intracellular parasite Toxoplasma gondii associates with the parasitophorous vacuole membrane through hydrophobic interactions." **269**(21): 15350-15357.

Otero, M., S. A. Calarota, et al. (2004). "Resiquimod is a modest adjuvant for HIV-1 gag-based genetic immunization in a mouse model." Vaccine **22**(13-14): 1782-90.

Ozaki, K., H. Sugino, et al. (1983). "Isolation and characterization of Physarum profilin." J Biochem **93**(1): 295-8.

Ozinsky, A., D. M. Underhill, et al. (2000). "The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(25): 13766-71.

Paavonen, J., D. Jenkins, et al. (2007). "Efficacy of a prophylactic adjuvanted bivalent L1 virus-like-particle vaccine against infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: an interim analysis of a phase III double-blind, randomised controlled trial." Lancet **369**(9580): 2161-70.

Pardoux, C., C. Asselin-Paturel, et al. (1997). "Functional interaction between TGF-beta and IL-12 in human primary allogeneic cytotoxicity and proliferative response." J Immunol **158**(1): 136-43.

Parker, S. J., C. W. Roberts, et al. (1991). "CD8+ T cells are the major lymphocyte subpopulation involved in the protective immune response to Toxoplasma gondii in mice." Clin Exp Immunol **84**(2): 207-12.

Parkinson, T. (2008). "The future of toll-like receptor therapeutics." Curr Opin Mol Ther **10**(1): 21-31.

Pavia, C. S., S. J. Bittker, et al. (1992). "Passive immunization protects guinea pigs from lethal Toxoplasma infection." FEMS Microbiol Immunol **4**(2): 97-104.

Pepper, M., F. Dzierszinski, et al. (2004). "Development of a system to study CD4+-T-cell responses to transgenic ovalbumin-expressing Toxoplasma gondii during toxoplasmosis." Infect Immun **72**(12): 7240-6.

Pepper, M., F. Dzierszinski, et al. (2008). "Plasmacytoid dendritic cells are activated by Toxoplasma gondii to present antigen and produce cytokines." J Immunol **180**(9): 6229-36.

Persing, D. H., R. N. Coler, et al. (2002). "Taking toll: lipid A mimetics as adjuvants and immunomodulators." Trends Microbiol **10**(10 Suppl): S32-7.

Peterson, J. L., M. D. Willard, et al. (1991). "Toxoplasmosis in two cats with inflammatory intestinal disease." J Am Vet Med Assoc **199**(4): 473-6.

Pfefferkorn, E. R., M. Eckel, et al. (1986). "Interferon-gamma suppresses the growth of Toxoplasma gondii in human fibroblasts through starvation for tryptophan." Mol Biochem Parasitol **20**(3): 215-24.

Plattner, F., F. Yarovinsky, et al. (2008). "Toxoplasma profilin is essential for host cell invasion and TLR11-dependent induction of an interleukin-12 response." Cell Host Microbe **3**(2): 77-87.

Pockros, P. J., D. Guyader, et al. (2007). "Oral resiquimod in chronic HCV infection: safety and efficacy in 2 placebo-controlled, double-blind phase IIa studies." J Hepatol **47**(2): 174-82.

Polet, D., A. Lambrechts, et al. (2006). "Caenorhabditis elegans expresses three functional
profilins in a tissue-specific manner." Cell Motil Cytoskeleton **63**(1): 14-28.

Pomeroy, C. and G. A. Filice (1992). "Pulmonary toxoplasmosis: a review." Clin Infect Dis **14**(4): 863-70.

Puggioni, F., S. R. Durham, et al. (2005). "Monophosphoryl lipid A (MPL) promotes allergen-induced immune deviation in favour of Th1 responses." Allergy **60**(5): 678-84.

Purner, M. B., R. L. Berens, et al. (1996). "CD4-mediated and CD8-mediated cytotoxic and proliferative immune responses to Toxoplasma gondii in seropositive humans." Infect Immun **64**(10): 4330-8.

Qu, D., S. Wang, et al. (2008). "Protective effect of a DNA vaccine delivered in attenuated Salmonella typhimurium against Toxoplasma gondii infection in mice." Vaccine **26**(35): 4541-8.

Rabaud, C., T. May, et al. (1994). "Extracerebral toxoplasmosis in patients infected with HIV. A French National Survey." Medicine (Baltimore) **73**(6): 306-14.

Rabaud, C., T. May, et al. (1996). "Pulmonary toxoplasmosis in patients infected with human immunodeficiency virus: a French National Survey." Clin Infect Dis **23**(6): 1249-54.

Rachinel, N., D. Buzoni-Gatel, et al. (2004). "The induction of acute ileitis by a single microbial antigen of Toxoplasma gondii." J Immunol **173**(4): 2725-35.

Raffi, F., J. P. Aboulker, et al. (1997). "A prospective study of criteria for the diagnosis of toxoplasmic encephalitis in 186 AIDS patients. The BIOTOXO Study Group." Aids **11**(2): 177-84.

Reichstein, E. and E. D. Korn (1979). "Acanthamoeba profilin. A protein of low molecular weight from Acanpthamoeba castellanii that inhibits actin nucleation." J Biol Chem **254**(13): 6174-9.

Reis e Sousa, C., S. Hieny, et al. (1997). "In vivo microbial stimulation induces rapid CD40 ligand-independent production of interleukin 12 by dendritic cells and their redistribution to T cell areas." J Exp Med **186**(11): 1819-29.

Rescigno, M., G. Rotta, et al. (2001). "Dendritic cells shuttle microbes across gut epithelial monolayers." Immunobiology **204**(5): 572-81.

Ribi, E., J. L. Cantrell, et al. (1984). "Lipid A and immunotherapy." Rev Infect Dis **6**(4): 567-72.

Ridel, P. R., C. Auriault, et al. (1988). "Protective role of IgE in immunocompromised rat toxoplasmosis." J Immunol **141**(3): 978-83.

Robben, P. M., D. G. Mordue, et al. (2004). "Production of IL-12 by macrophages infected with Toxoplasma gondii depends on the parasite genotype." J Immunol **172**(6): 3686-94.

Robinson, H. L. and Pertmer (1998). Nucléic Acid immunizations. Current Protocol Immunology. J. w. s. New York. New York. **2, 14:** 1-19.

Rodriguez, A., A. Regnault, et al. (1999). "Selective transport of internalized antigens to the cytosol for MHC class I presentation in dendritic cells." Nat Cell Biol **1**(6): 362-8.

Rosenberg, B., D. A. Juckett, et al. (2005). "Protein from intestinal Eimeria protozoan stimulates IL-12 release from dendritic cells, exhibits antitumor properties in vivo and is correlated with low intestinal tumorigenicity." Int J Cancer **114**(5): 756-65.

Russell, D. G. and R. E. Sinden (1981). "The role of cytoskeleton in the motility of Coccidian sporozoites."

Rutz, M., J. Metzger, et al. (2004). "Toll-like receptor 9 binds single-stranded CpG-DNA in a sequence- and pH-dependent manner." Eur J Immunol **34**(9): 2541-50.

Saavedra, R., M. A. Becerril, et al. (1996). "Epitopes recognized by human T lymphocytes in the ROP2 protein antigen of Toxoplasma gondii." Infect Immun **64**(9): 3858-62.

Sacks, D. and A. Sher (2002). "Evasion of innate immunity by parasitic protozoa." Nat Immunol **3**(11): 1041-7.

Saeij, J. P., J. P. Boyle, et al. (2005). "Differences among the three major strains of Toxoplasma gondii and their specific interactions with the infected host." Trends Parasitol **21**(10): 476-81.

Saeij, J. P., J. P. Boyle, et al. (2006). "Polymorphic secreted kinases are key virulence factors in toxoplasmosis." Science **314**(5806): 1780-3.

Saeij, J. P., S. Coller, et al. (2007). "Toxoplasma co-opts host gene expression by injection of a polymorphic kinase homologue." Nature **445**(7125): 324-7.

Sandor, F. and M. Buc (2005). "Toll-like receptors. II. Distribution and pathways involved in TLR signalling." Folia Biol (Praha) **51**(6): 188-97.

Savov, J. D., D. M. Brass, et al. (2005). "Toll-like receptor 4 antagonist (E5564) prevents the chronic airway response to inhaled lipopolysaccharide." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **289**(2): L329-37.

Sayles, P. C., G. W. Gibson, et al. (2000). "B cells are essential for vaccination-induced resistance to virulent Toxoplasma gondii." Infect Immun **68**(3): 1026-33.

Scanga, C. A., J. Aliberti, et al. (2002). "Cutting edge: MyD88 is required for resistance to Toxoplasma gondii infection and regulates parasite-induced IL-12 production by dendritic cells." J Immunol **168**(12): 5997-6001.

Scharton-Kersten, T. M., T. A. Wynn, et al. (1996). "In the absence of endogenous IFN-gamma, mice develop unimpaired IL-12 responses to Toxoplasma gondii while failing to control acute infection." J Immunol **157**(9): 4045-54.

Scharton-Kersten, T. M., G. Yap, et al. (1997). "Inducible nitric oxide is essential for host control of persistent but not acute infection with the intracellular pathogen Toxoplasma gondii." J Exp Med **185**(7): 1261-73.

Schmitz, S., M. Grainger, et al. (2005). "Malaria parasite actin filaments are very short." J Mol Biol **349**(1): 113-25.

Schromm, A. B., E. Lien, et al. (2001). "Molecular genetic analysis of an endotoxin nonresponder mutant cell line: a point mutation in a conserved region of MD-2 abolishes endotoxin-induced signaling." J Exp Med **194**(1): 79-88.

Schuler, H. and K. Matuschewski (2006). "Regulation of apicomplexan microfilament dynamics by a minimal set of actin-binding proteins." Traffic **7**(11): 1433-9.

Schulthess, J., D. Fourreau, et al. (2008). "Mucosal immunity in Toxoplasma gondii infection." Parasite **15**(3): 389-95.

Schulz, O., A. D. Edwards, et al. (2000). "CD40 triggering of heterodimeric IL-12 p70 production by dendritic cells in vivo requires a microbial priming signal." Immunity **13**(4): 453-62.

Schwab, J. C., C. J. M. Beckers, et al. (1994). "The Parasitophorous Vacuole Membrane Surrounding Intracellular Toxoplasma Gondii Functions as a Molecular Sieve." **91**(2): 509-513.

Schwartzman, J. D. and L. D. and Saffer (1992). "How Toxoplasma gondii gets into and out of host cells."

Scorza, T., S. D'Souza, et al. (2003). "A GRA1 DNA vaccine primes cytolytic CD8(+) T cells to control acute Toxoplasma gondii infection." Infect Immun **71**(1): 309-16.

Seabra, S. H., R. A. DaMatta, et al. (2004). "Endogenous polyamine levels in macrophages is sufficient to support growth of Toxoplasma gondii." J Parasitol **90**(3): 455-60.

Seguin, R. and L. H. Kasper (1999). "Sensitized lymphocytes and CD40 ligation augment interleukin-12 production by human dendritic cells in response to Toxoplasma gondii." J Infect Dis **179**(2): 467-74.

Seya, T., T. Akazawa, et al. (2006). "Role of Toll-like receptors in adjuvant-augmented immune therapies." Evid Based Complement Alternat Med **3**(1): 31-8; discussion 133-7.

Sher, A., I. P. Oswald, et al. (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." J Immunol **150**(9): 3982-9.

Sibalic, D., O. Djurkovic-Djakovic, et al. (1990). "Onset of ocular complications in congenital toxoplasmosis associated with immunoglobulin M antibodies to Toxoplasma gondii." Eur J Clin Microbiol Infect Dis **9**(9): 671-4.

Sibley, L. D. and J. C. Boothroyd (1992). "Construction of a Molecular Karyotype for Toxoplasma-Gondii." **51**(2): 291-300.

Sibley, L. D., S. Hakansson, et al. (1998). "Gliding motility: an efficient mechanism for cell penetration." Curr Biol **8**(1): R12-4.

Sibley, L. D., I. R. Niesman, et al. (1995). "Regulated secretion of multi-lamellar vesicles leads to formation of a tubulovesicular network in host-cell vacuoles occupied by Toxoplasma gondii." **108**(Part 4): 1669-1677.

Sibley, L. D., E. Weidner, et al. (1985). "Phagosome acidification blocked by intracellular Toxoplasma gondii."

Silva, N. M., C. V. Rodrigues, et al. (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." Infect Immun **70**(2): 859-68.

Sklenar, I., T. C. Jones, et al. (1986). "Association of symptomatic human infection with Toxoplasma gondii with imbalance of monocytes and antigen-specific T cell subsets." J Infect Dis **153**(2): 315-24.

Smorlesi, A., F. Papalini, et al. (2005). "Imiquimod and S-27609 as adjuvants of DNA vaccination in a transgenic murine model of HER2/neu-positive mammary carcinoma." Gene Ther **12**(17): 1324-32.

Soldati, D., J. F. Dubremetz, et al. (2001). "Microneme proteins: structural and functional requirements to promote adhesion and invasion by the apicomplexan parasite Toxoplasma gondii." Int J Parasitol **31**(12): 1293-302.

Somboonwiwat, K., P. Supungul, et al. (2006). "Differentially expressed genes in hemocytes of Vibrio harveyi-challenged shrimp Penaeus monodon." J Biochem Mol Biol **39**(1): 26-36.

Song, K. D., H. S. Lillehoj, et al. (2000). "A DNA vaccine encoding a conserved Eimeria protein induces protective immunity against live Eimeria acervulina challenge." Vaccine **19**(2-3): 243-52.

Sparwasser, T., R. M. Vabulas, et al. (2000). "Bacterial CpG-DNA activates dendritic cells in vivo: T helper cell-independent cytotoxic T cell responses to soluble proteins." Eur J Immunol **30**(12): 3591-7.

Spear, W., D. Chan, et al. (2006). "The host cell transcription factor hypoxia-inducible factor 1 is required for Toxoplasma gondii growth and survival at physiological oxygen levels." Cell Microbiol **8**(2): 339-52.

Speer, C. A. and J. P. Dubey (1998). "Ultrastructure of early stages of infections in mice fed Toxoplasma gondii oocysts." Parasitology **116 (Pt 1)**: 35-42.

Staiger, C. J., M. Yuan, et al. (1994). "Microinjected profilin affects cytoplasmic streaming in plant cells by rapidly depolymerizing actin microfilaments." Curr Biol **4**(3): 215-9.

Stanberry, L. R., S. L. Spruance, et al. (2002). "Glycoprotein-D-adjuvant vaccine to prevent genital herpes." N Engl J Med **347**(21): 1652-61.

Stanley, M. A. (2002). "Imiquimod and the imidazoquinolones: mechanism of action and therapeutic potential." Clin Exp Dermatol **27**(7): 571-7.

Stenger, S., N. Donhauser, et al. (1996). "Reactivation of latent leishmaniasis by inhibition of inducible nitric oxide synthase." J Exp Med **183**(4): 1501-14.

Strasser, J. E., R. L. Arnold, et al. (2000). "Herpes simplex virus DNA vaccine efficacy: effect of glycoprotein D plasmid constructs." J Infect Dis **182**(5): 1304-10.

Subauste, C. S., A. H. Koniaris, et al. (1991). "Murine CD8+ cytotoxic T lymphocytes lyse Toxoplasma gondii-infected cells." J Immunol **147**(11): 3955-9.

Sukhumavasi, W., C. E. Egan, et al. (2008). "TLR adaptor MyD88 is essential for pathogen control during oral toxoplasma gondii infection but not adaptive immunity induced by a vaccine strain of the parasite." J Immunol **181**(5): 3464-73.

Sukthana, Y. (2006). "Toxoplasmosis: beyond animals to humans." Trends Parasitol **22**(3): 137-42.

SussToby, E., J. Zimmerberg, et al. (1996). "Toxoplasma invasion: The parasitophorous vacuole is formed from host cell plasma membrane and pinches off via a fission pore." **93**(16): 8413-8418.

Suzuki, Y., F. K. Conley, et al. (1989). "Importance of endogenous IFN-gamma for prevention of toxoplasmic encephalitis in mice." J Immunol **143**(6): 2045-50.

Suzuki, Y., F. K. Conley, et al. (1990). "Treatment of toxoplasmic encephalitis in mice with recombinant gamma interferon." Infect Immun **58**(9): 3050-5.

suzuki Y, H. S., Wang X, Wen X, (2007). "Cerebral toxoplasmosis: pathogenesis and host resistance." In:Weiss LM, Kim K, Toxoplasma gondii, the model apicomplexan: Perspectives and methodes. **567-591.**

Suzuki Y, O. M., Schreiber RD, Remington JS (1988). "Intrferon gamma: the major mediator of resistance against Toxoplasma gondii." Science **240**(4851): 516-18.

Suzuki, Y. and J. S. Remington (1988). "Dual regulation of resistance against Toxoplasma gondii infection by Lyt-2+ and Lyt-1+, L3T4+ T cells in mice." J Immunol **140**(11): 3943-6.

Suzuki, Y. and J. S. Remington (1990). "The effect of anti-IFN-gamma antibody on the protective effect of Lyt-2+ immune T cells against toxoplasmosis in mice." J Immunol **144**(5): 1954-6.

Svanholm, C., B. Lowenadler, et al. (1997). "Amplification of T-cell and antibody responses in DNA-based immunization with HIV-1 Nef by co-injection with a GM-CSF expression vector." Scand J Immunol **46**(3): 298-303.

Sweeney, S. E. and G. S. Firestein (2007). "Primer: signal transduction in rheumatic disease--a clinician's guide." Nat Clin Pract Rheumatol **3**(11): 651-60.

Takeshita, F., T. Tanaka, et al. (2006). "Toll-like receptor adaptor molecules enhance DNA-raised adaptive immune responses against influenza and tumors through activation of innate immunity." J Virol **80**(13): 6218-24.

Tao, A. L. and S. H. He (2005). "Cloning, expression, and characterization of pollen allergens from Humulus scandens (Lour) Merr and Ambrosia artemisiifolia L." Acta Pharmacol Sin **26**(10): 1225-32.

Taylor, S., A. Barragan, et al. (2006). "A secreted serine-threonine kinase determines virulence in the eukaryotic pathogen Toxoplasma gondii." Science **314**(5806): 1776-80.

Temperley, N. D., S. Berlin, et al. (2008). "Evolution of the chicken Toll-like receptor gene family: a story of gene gain and gene loss." BMC Genomics **9**: 62.

Tenter, A. M., A. R. Heckeroth, et al. (2000). "Toxoplasma gondii: from animals to humans." Int J Parasitol **30**(12-13): 1217-58.

Testerman, T. L., J. F. Gerster, et al. (1995). "Cytokine induction by the immunomodulators imiquimod and S-27609." J Leukoc Biol **58**(3): 365-72.

Thoelen, S., N. De Clercq, et al. (2001). "A prophylactic hepatitis B vaccine with a novel adjuvant system." Vaccine **19**(17-19): 2400-3.

Thomsen, L. L., P. Topley, et al. (2004). "Imiquimod and resiquimod in a mouse model: adjuvants for DNA vaccination by particle-mediated immunotherapeutic delivery." Vaccine **22**(13-14): 1799-809.

Tilley, M., M. E. Fichera, et al. (1997). "Toxoplasma gondii sporozoites form a transient parasitophorous vacuole that is impermeable and contains only a subset of dense-granule proteins." Infect Immun **65**(11): 4598-605.

Tomavo, S. (2001). "The differential expression of multiple isoenzyme forms during stage conversion of Toxoplasma gondii: an adaptive developmental strategy." Int J Parasitol **31**(10): 1023-31.

Tomley, F. M. and D. S. Soldati (2001). "Mix and match modules: structure and function of microneme proteins in apicomplexan parasites." Trends Parasitol **17**(2): 81-8.

Torres, C. A., A. Iwasaki, et al. (1997). "Differential dependence on target site tissue for gene gun and intramuscular DNA immunizations." J Immunol **158**(10): 4529-32.

Torrey, E. F. and R. H. Yolken (2003). "Toxoplasma gondii and schizophrenia." Emerg Infect Dis **9**(11): 1375-80.

Uematsu, S. and S. Akira (2007). "Toll-like receptors and Type I interferons." J Biol Chem **282**(21): 15319-23.

Ulmer, J. B., R. R. Deck, et al. (1996). "Generation of MHC class I-restricted cytotoxic T lymphocytes by expression of a viral protein in muscle cells: antigen presentation by non-muscle cells." Immunology **89**(1): 59-67.

Ulmer, J. B., J. J. Donnelly, et al. (1993). "Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein." Science **259**(5102): 1745-9.

Valenta, R. and D. Kraft (2001). "Recombinant allergen molecules: tools to study effector cell activation." Immunol Rev **179**: 119-27.

van Duin, D., R. Medzhitov, et al. (2006). "Triggering TLR signaling in vaccination." Trends Immunol **27**(1): 49-55.

van Endert, P. M., L. Saveanu, et al. (2002). "Powering the peptide pump: TAP crosstalk with energetic nucleotides." Trends Biochem Sci **27**(9): 454-61.

Vasilakos, J. P., R. M. Smith, et al. (2000). "Adjuvant activities of immune response modifier R-848: comparison with CpG ODN." Cell Immunol **204**(1): 64-74.

Vollmer, T. L., M. K. Waldor, et al. (1987). "Depletion of T-4+ lymphocytes with monoclonal antibody reactivates toxoplasmosis in the central nervous system: a model of superinfection in AIDS." J Immunol **138**(11): 3737-41.

Waller, R. F., P. J. Keeling, et al. (1998). "Nuclear-encoded proteins target to the plastid in Toxoplasma gondii and Plasmodium falciparum." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(21): 12352-7.

Wang, Z., P. J. Troilo, et al. (2004). "Detection of integration of plasmid DNA into host genomic DNA following intramuscular injection and electroporation." Gene Ther **11**(8): 711-21.

Watts, C. (2004). "The exogenous pathway for antigen presentation on major histocompatibility complex class II and CD1 molecules." Nat Immunol **5**(7): 685-92.

Werk, R. and S. Fischer (1982). "Short communication: Attempts to infect plant protoplats with Toxoplasmagondii." 211-3.

Wetzel, D. M., S. Hakansson, et al. (2003). "Actin filament polymerization regulates gliding motility by apicomplexan parasites." Mol Biol Cell **14**(2): 396-406.

Wheeler, M., X. Cortez-Gonzalez, et al. (2006). "Ex vivo programming of antigen-presenting B lymphocytes: considerations on DNA uptake and cell activation." Int Rev Immunol **25**(3-4): 83-97.

Wille-Reece, U., B. J. Flynn, et al. (2005). "HIV Gag protein conjugated to a Toll-like receptor 7/8 agonist improves the magnitude and quality of Th1 and CD8+ T cell responses in nonhuman primates." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(42): 15190-4.

Wilson, N. S. and J. A. Villadangos (2005). "Regulation of antigen presentation and cross-presentation in the dendritic cell network: facts, hypothesis, and immunological implications." Adv Immunol **86**: 241-305.

Witke, W., A. V. Podtelejnikov, et al. (1998). "In mouse brain profilin I and profilin II associate with regulators of the endocytic pathway and actin assembly." Embo J **17**(4): 967-76.

Witke, W., J. D. Sutherland, et al. (2001). "Profilin I is essential for cell survival and cell division in early mouse development." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(7): 3832-6.

Wittrup, A., S. Sandgren, et al. (2007). "Identification of proteins released by mammalian cells that mediate DNA internalization through proteoglycan-dependent macropinocytosis." J Biol Chem **282**(38): 27897-904.

Wolff, J. A., R. W. Malone, et al. (1990). "Direct gene transfer into mouse muscle in vivo." Science **247**(4949 Pt 1): 1465-8.

Wreghitt, T. G., M. Hakim, et al. (1989). "Toxoplasmosis in heart and heart and lung transplant recipients." J Clin Pathol **42**(2): 194-9.

Xiang, Z. and H. C. Ertl (1995). "Manipulation of the immune response to a plasmid-encoded viral antigen by coinoculation with plasmids expressing cytokines." Immunity **2**(2): 129-35.

Xue, M., S. He, et al. (2008). "Evaluation of the immune response elicited by multi-antigenic DNA vaccine expressing SAG1, ROP2 and GRA2 against Toxoplasma gondii." Parasitol Int **57**(4): 424-9.

Yang, T. H., F. Aosai, et al. (1995). "Enhanced cytotoxicity of IFN-gamma-producing CD4+ cytotoxic T lymphocytes specific for T. gondii-infected human melanoma cells." J Immunol **154**(1): 290-8.

Yao, X. D., S. Fernandez, et al. (2007). "Expression of Toll-like receptors in murine vaginal epithelium is affected by the estrous cycle and stromal cells." J Reprod Immunol **75**(2): 106-19.

Yap, G., M. Pesin, et al. (2000). "Cutting edge: IL-12 is required for the maintenance of IFN-gamma production in T cells mediating chronic resistance to the intracellular pathogen, Toxoplasma gondii." J Immunol **165**(2): 628-31.

Yap, G. S., M. H. Shaw, et al. (2006). "Genetic analysis of host resistance to intracellular pathogens: lessons from studies of Toxoplasma gondii infection." Microbes Infect **8**(4): 1174-8.

Yap, G. S. and A. Sher (1999). "Cell-mediated immunity to Toxoplasma gondii: initiation, regulation and effector function." Immunobiology **201**(2): 240-7.

Yarovinsky, F. (2008). "Toll-like receptors and their role in host resistance to Toxoplasma gondii." Immunol Lett **119**(1-2): 17-21.

Yarovinsky, F., H. Kanzler, et al. (2006). "Toll-like receptor recognition regulates immunodominance in an antimicrobial CD4+ T cell response." Immunity **25**(4): 655-64.

Yarovinsky, F., D. Zhang, et al. (2005). "TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein." Science **308**(5728): 1626-9.

Yokoyama, M., J. Zhang, et al. (1995). "DNA immunization confers protection against lethal lymphocytic choriomeningitis virus infection." J Virol **69**(4): 2684-8.

Zaks, K., M. Jordan, et al. (2006). "Efficient immunization and cross-priming by vaccine adjuvants containing TLR3 or TLR9 agonists complexed to cationic liposomes." J Immunol **176**(12): 7335-45.

Zarozinski, C. C., E. F. Fynan, et al. (1995). "Protective CTL-dependent immunity and enhanced immunopathology in mice immunized by particle bombardment with DNA encoding an internal virion protein." J Immunol **154**(8): 4010-7.

Zhang, D., G. Zhang, et al. (2004). "A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria." Science **303**(5663): 1522-6.

Zhang, G. and S. Ghosh (2001). "Toll-like receptor-mediated NF-kappaB activation: a phylogenetically conserved paradigm in innate immunity." J Clin Invest **107**(1): 13-9.

Zhao, Q., S. Matson, et al. (1993). "Comparison of cellular binding and uptake of antisense phosphodiester, phosphorothioate, and mixed phosphorothioate and methylphosphonate oligonucleotides." Antisense Res Dev **3**(1): 53-66.

Zuber, A. K., A. Brave, et al. (2004). "Topical delivery of imiquimod to a mouse model as a novel adjuvant for human immunodeficiency virus (HIV) DNA." Vaccine **22**(13-14): 1791-8.

Annexes

Liste des publications Scientifiques

Publications dans des journaux scientifiques internationaux

Hedhli.D, Judge JW, Rosenberg.B, Dimier-poisson.I, Mévèlec.M.N. **Protective immunity against *Toxoplasma* challenge in mice by coadministration of *T. gondii* antigens and *Eimeria* profilin-like protein as an adjuvant.** article sous presse dans Vaccine.

Hedhli.D, Moiré.N, Dimier-poisson, Fabrice laurent, Haroon Akbar, Mévéléc.M.N. **Evaluation of protective effect of DNA vaccines encoding the *T. gondii* profilin against chronical infection in mice**. en cours de Préparation.

Ismael.A.B, Hedhli.D, Cérède.O, Lebrun.M, Dimier-Poisson.I, and Mévélec.M.N. **Further Analysis of Protection Induced by the MIC3 DNA Vaccine. A Major Role of CD4 and CD8 T Cells.** Article sous presse dans vaccine.

Publications dans des événements scientifiques

- Hedhli D, Ghozzi R, Boutiba I, Kammoun A, Ben Redjeb S. Implication of multiresistant *Acinetobacter Baumannii* in nosocomial outbreaks. Abstract dans **International Journal of Antimicrobial Agents**, vol 24S (2004) : S128-S252. Présenté en Poster.

- Hedhli D, Dimier-Poisson I et Mévéléc M.N. Investigation du rôle de la profiline de l'Apicomplexe *Toxoplasma gondii* dans la stimulation/maturation des cellules dendritiques d'une part et dans la stratégie de protection contre T.gondii d'autre part. Abstract au XX ème Colloque **Biotechnocentre**, 25 et 26 Octobre 2006, Domaine de Seillac, Région centre, France. Présenté en Poster.

- Hedhli D, Dimier-Poisson I et Mévéléc M.N. Investigation du rôle de la profiline de l'Apicomplexe *Toxoplasma gondii* dans la stimulation/maturation des cellules

dendritiques d'une part et dans la stratégie de protection contre T.gondii d'autre part. Abstract, **Club de vaccinologie 2006** organisé par la **société française d'immunologie**, 11 et 12 décembre 2006, Institut Pasteur, Paris 15. Présenté en Poster.

- Hedhli D, Mévéléc.M.N et Dimier-Poisson I. Evaluation of protective effect of recombinant protein of Eimeria used as an adjuvant by nasal route against chronical toxoplasmosis in mice. **Forum de l'école doctorale** santé, Sciences et Technologies, Juin 2008, Polytechniques des 2 lions, Tours. Communication orale.

- Hedhli D, Mévéléc.M.N et Dimier-Poisson I. Evaluation of protective effect of recombinant protein of Eimeria used as an adjuvant by nasal route against chronical toxoplasmosis in mice. **Club Toxo** organisé par la **Société Française de Parasitologie**, Juin 2008, Institue Cochin, Paris. Communication orale.

- Hedhli D, Mévéléc.M.N et Dimier-Poisson I. Evaluation of protective effect of recombinant protein of Eimeria used as an adjuvant by intraperitoneal route against chronical toxoplasmosis in mice. Abstract au **Xth European Multicolloquium of Parasitology** 24- 28 Août 2008, Paris. Présentation en communication orale.

Dorsaf HEDHLI

Etude de l'effet prophylactique, propriétés immunogènes et effet adjuvant, de la profiline des Apicomplexess contre la toxoplasmose chronique en modèle murin

Résumé

Toxoplasma gondii, protozoaire intracellulaire obligatoire, est agent responsable de la toxoplasmose, infection qui revêt un caractère sévère en cours de toxoplasmoses cérébrales ou congénitales en médecines humaine et vétérinaire ; le développement de stratégies vaccinales efficaces s'impose.
Au cours de notre étude nous avons développé deux approches vaccinales basées sur l'utilisatio des profilines des apicomplexes en tant qu'immunogène d'une part et en tant qu'adjuvant d'autre part, contre la toxoplasmose chronique chez la souris.
Dans une stratégie de vaccination ADN, les profilines de *T. gondii* et de *N. caninum*, induisent des réponses humorale et cellulaire de type Th1 et confèrent une protection (réduction du nombre de kystes cérébraux de 40%). La forme cytoplasmique de la profiline de *T. gondii* induit une réponse humorale similaire, une réponse cellulaire moindre et ne confère pas de protection. La profiline d'*Eimeria tenella* (protéine recombinante rEA), agoniste de TLR 11, a été utilisée dans une stratégie d'immunisation par voie intrapéritonéale et nasale avec de l'extrait parasitaire de *T. gondii*. Par voie intrapéritonéale, rEA augmente les réponses humorale et cellulaire (Th1) et la protection par rapport aux souris immunisées avec l'extrait parasitaire seul (62% de réduction du nombre de kystes contre 36% seulement pour le lot immunisé avec l'extrait parasitaire seul). Par voie nasale, réduction de la charge parasitaire de 50% alors que les souris immunisées avec l'extrait seul ne sont pas protégées.

Mots clés : *Toxoplasma gondii*, vaccination, profiline des apicomplexes.

Summary

Toxoplasma gondii, an obligate intracellular protozoan, is the etiological agent of toxoplasmosis. This infection has severe consequences during cerebral or congenital toxoplasmosis both in human and veterinary medicines. No vaccine is currently available, so the design of efficient vaccine strategies is still a topical question.
In this study, both the immunogenicity and the adjuvant properties of apicomplexan profilins were evaluated in a vaccine strategy against chronic infection in mice.
DNA vaccination with *T. gondii* profilin and *N. caninum* profilin, induced humoral and cellular responses (Th1) and conferred protection (40% brain cysts reduction). The cytoplasmic form of *T. gondii* profilin induced a similar humoral response but a lower cellular immune response and did not confer protection.
Recombinant *Eimeria tenella* profilin (rEA) was used as an agonist of TLR 11 within a strategy of immunization by intraperitoneal and nasal routes in combination with *T. gondii* antigen extract. By intraperitoneal route, rEA enhanced humoral and cellular immune responses and conferred a better protection in mice compared to mice immunized with *T. gondii* antigen alone (62% brain cysts reduction versus 32%).By nasal route, rEA enhanced both humoral and cellular immune responses (Th1) but to a less extent compared to the intraperitoneal route. However, a significant protection was observed (50% brain cysts reduction) compared to mice immunized with *T. gondii* antigen alone, which were not protected.

Key words: *Toxoplasma gondii*, vaccination, profilins of apicomplexa.