

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Approche d'un sérodiagnostic affiné de la toxoplasmose par électrophorèse, électrotransfert, immuno-enzyme essai "Western Blotting"

Rossomme, Philippe

Award date:
1986

Awarding institution:
Universite de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

**APPROCHE D'UN SÉRODIAGNOSTIC
AFFINÉ DE LA TOXOPLASMOSE PAR
ÉLECTROPHORÈSE, ÉLECTROTRANSFERT,
IMMUNO-ENZYME ESSAI « WESTERN
BLOTTING ».**

promoteurs :

Messieurs DINANT
MENGEOT

membres du jury :

Messieurs REMACLE
TRAUSCH
LETESSON

Philippe ROSSOMME

1985 - 86

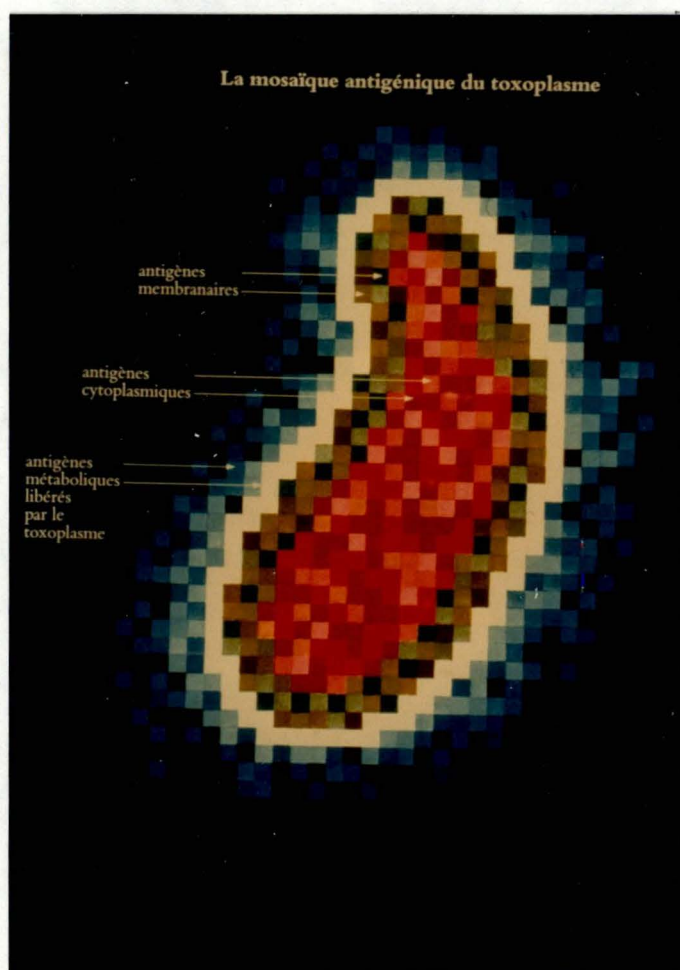
Au terme de cette année, je tiens à exprimer toute ma gratitude à mes deux promoteurs pour les judicieux conseils qu'ils m'ont prodigués : Monsieur DINANT, qui m'a accueilli dans son laboratoire de biologie clinique du Centre Hospitalier Reine Fabiola à Avelais et Monsieur MENGEOT, qui m'a permis de mener à bien ce travail enrichissant.

Pour son aide très précieuse, sa disponibilité et ses encouragements, de tout coeur, je remercie Monsieur SMET.

Mes remerciements s'adressent aussi au département du Professeur CAPRON de l'Institut Pasteur de Lille, qui m'a procuré le matériel biologique.

Je ne peux oublier également le personnel du laboratoire de biologie clinique et principalement les membres du département de sérologie qui m'ont permis de travailler dans une ambiance amicale, ainsi que les membres du département de biologie animale des Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix de Namur pour leur aide matérielle et leurs conseils.

Enfin, merci à toutes les personnes qui, directement ou indirectement, ont contribué à la réalisation de ce mémoire.



**Les mystérieux et omniprésents
corps en arc ont un caractère pathogène
aussi indécis que leur histoire naturelle.**

TABLE DES MATIERES

	<u>Pages</u>
- TABLE DES MATIERES	1
- ABREVIATIONS UTILISEES	5
I. INTRODUCTION	6
II. HISTORIQUE	7
III. PARASITOLOGIE	8
3.1. Introduction	8
3.2. Morphologie du toxoplasme	8
3.2.1. Le trophozoïte	10
3.2.2. Le kyste	11
3.2.3. L'oocyste	12
3.3. Cycle de vie	12
3.3.1. Evolution chez l'hôte définitif: le chat	13
3.3.2. Evolution chez les hôtes intermédiaires	13
IV. PATHOLOGIE HUMAINE	15
4.1. Introduction	15
4.2. Physiopathologie	15
4.3. Les différentes formes cliniques de la toxoplasmose	16
4.3.1. Toxoplasmose acquise	16
4.3.2. Toxoplasmose congénitale	17
4.4. Traitement et prévention de la toxoplasmose	20

V. IMMUNOLOGIE DE LA TOXOPLASMOSE	21
5.1. <u>Toxoplasma gondii</u> : une mosaïque antigénique	21
5.2. L'immunité cellulaire	21
5.2.1. Son exploration	22
5.3. L'immunité humorale	22
5.3.1. Son exploration	23
5.4. Cinétique des anticorps toxoplasmiques	37
5.5. Interprétation sérologique de la toxoplasmose acquise	38
5.6. Interprétation sérologique de la toxoplasmose chez le nouveau-né	40
5.6.1. Les Ig chez le fœtus et le nouveau-né	41
VI. RESOLUTION DE L'ANTIGENE TOXOPLASMIQUE EN PAGE SDS	42
6.1. Les antigènes	42
6.1.1. Multiplication de la souche	42
6.1.2. Traitement des antigènes toxoplasmiques	43
6.2. Préparation du gel de polyacrylamide SDS	44
6.2.1. Le matériel	44
6.2.2. Le gel en gradient concave	46
6.3. Résolution de l'antigène par électrophorèse	48
6.3.1. Les standards poids moléculaires	48
6.3.2. La migration	51
VII. TRANSFERT SUR NITROCELLULOSE DES COMPOSANTES PROTEIQUES DE L'ANTIGENE	52
7.1. Le blotting	52
7.2. La membrane de nitrocellulose	52
7.3. Les avantages du blotting	53

7.3.1. L'accessibilité	53
7.3.2. Liaison des protéines à la membrane	53
7.3.3. Fiabilité	53
VIII. LA REVELATION DES FRACTIONS IMMUNOGENES	54
8.1. Les colorations	54
8.2. Les méthodes immunologiques	54
8.2.1. Radio-immunoessai (RIA)	55
8.2.2. Enzyme-immunoessai (EIA)	55
8.2.3. Utilisation de l'EIA	56
8.3. Conclusions	60
IX. RESULTATS EXPERIMENTAUX	61
9.1. La mosaïque antigénique du toxoplasme	61
9.2. Les IgM	63
9.3. Les IgA	65
9.4. Les IgE	67
9.5. Les IgG	69
9.6. Les IgG (F(ab') ₂)	72
9.7. Tableau récapitulatif	74
9.8. Titres en IgG et IgM des sérums et positivité en blotting	75
X. INTERPRETATIONS DES RESULTATS	77
10.1 Les antigènes	77
10.2. Les anticorps	78
10.3. Les IgM	79
10.4. Les IgA	80
10.5. Les IgE	81
10.6. Les IgG	82
10.7. Reconnaissance antigénique	84
10.8. Cas d'un sérum particulier (3088)	85
10.9. Conclusions	86

XI. PERSPECTIVES D'AVENIR : UN VACCIN ?	89
11.1. Immunisation active	89
11.2. Immunisation passive	92
XII. CONCLUSION	93
- TECHNIQUES	96
- BIBLIOGRAPHIE	114

Abréviations utilisées

Ac	:	anticorps	
Ag	:	antigène	
anti-Ig-PO	:	anti-immunoglobuline couplée à la peroxydase	
BSA	:	sérum albumine bovine	
DOC	:	déoxycholate	$C_{24}H_{39}NaO_4$
EDTA	:	Titriplex [®] III	$C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \cdot 2H_2O$
HA	:	hémagglutination	
HRP color development	:	substance chromogène (4 chloro-1-naphtol)	
ICC	:	immuns complexes circulants	
IF	:	immunofluorescence	
Ig	:	immunoglobuline	
KD	:	kilodalton	
NC	:	nitrocellulose	
$(NH_4)_2SO_4$:	sulfate d'ammonium	
OMS	:	Organisation Mondiale de la santé	
PBS	:	phosphate buffered saline (tampon phosphate)	
PEG	:	polyéthylène glycol	
PM	:	poids moléculaire	
SDS	:	dodécyl sulfate de sodium	$C_{12}H_{25}NaO_4S$
TBS	:	tris buffered saline (tampon tris)	
TEMED	:	tétra méthyléthylènediamine	
TRIS	:	(Hydroxyméthyl)-aminométhane	$C_4H_{11}NO_3$
UI	:	Unité internationale	

I. INTRODUCTION

La toxoplasmose est une parasitose ubiquitaire dont l'agent est un protozoaire, Toxoplasma gondii (souche RH).

Elle présente un grand intérêt en médecine vétérinaire et humaine; principalement chez les sujets immunodéprimés et chez le fœtus qui par voie transplacentaire peut contracter la maladie avec des lésions graves.

La grande variété des antigènes toxoplasmiques explique la variété des techniques sérologiques utilisées en laboratoire clinique. Toutes ont leur valeur et leurs limites propres de sorte qu'il est toujours indispensable d'associer au minimum deux techniques, complémentaires dans leur signification, pour établir un diagnostic de toxoplasmose.

Le but de ce travail consiste en une étude destinée à identifier les fractions protéiques du toxoplasme séparées par une électrophorèse sur gel en gradient de polyacrylamide en milieu SDS (PAGE-SDS). Après transfert des fractions protéiques du gel de polyacrylamide sur nitrocellulose (électroblotting), nous tentons de caractériser les fractions protéiques immunogènes par une technique immunoenzymatique.

L'interprétation des résultats obtenus par les différents tests renseignera sur la cinétique des anticorps et l'évolution de la maladie.

II. HISTORIQUE

En raison de la nature complexe du toxoplasme et de la maladie, il s'est écoulé 62 ans entre la découverte du vecteur et la connaissance de son cycle biologique complet.

- 1908 : Nicolle et Manceaux découvrent chez un rongeur d'Afrique du Nord (Cténodactylus gondii) un protozoaire ayant une forme en "croissant". Ils le baptisent Toxoplasma gondii, du grec toxon (arc) et plasma (forme).
- 1923 : Janku découvre des kystes rétiniens chez un enfant atteint de toxoplasmose congénitale.
- 1937 : Sabin décrit les signes cliniques de la toxoplasmose humaine.
- 1948 : Sabin et Feldman décrivent le dye test.
- 1957 : Goldman et Kelen utilisent l'immunofluorescence pour explorer l'immunité humorale chez l'homme.
- 1970 : Simultanément, les équipes d'Hutchinson et de Frenkel mettent en évidence le cycle sexué du parasite chez le chat.

Ces dernières années, les parasitologues et les immunologistes tentent de reconstituer le "puzzle antigénique" du toxoplasme.

III. PARASITOLOGIE

3.1. Introduction

- Embranchement	: Protozoa
- Sous-embranchement	: Apicomplexa
- Classe	: Sporozoea
- Ordre	: Coccidiida
- Famille	: Eimeriidea
- Genre et espèce	: <u>Toxoplasma gondii</u>

Le toxoplasme est un parasite de toutes les cellules des animaux homéothermes sauf des globules rouges anucléés. Dans les tissus, il vit dans les macrophages du système réticulo-histiocytaire qui est le lieu de prédilection de la prolifération du toxoplasme. Il peut être isolé des nodules lymphoïdes, du liquide céphalorachidien ou du sang par inoculation intrapéritonéale ou intracérébrale d'une souris.

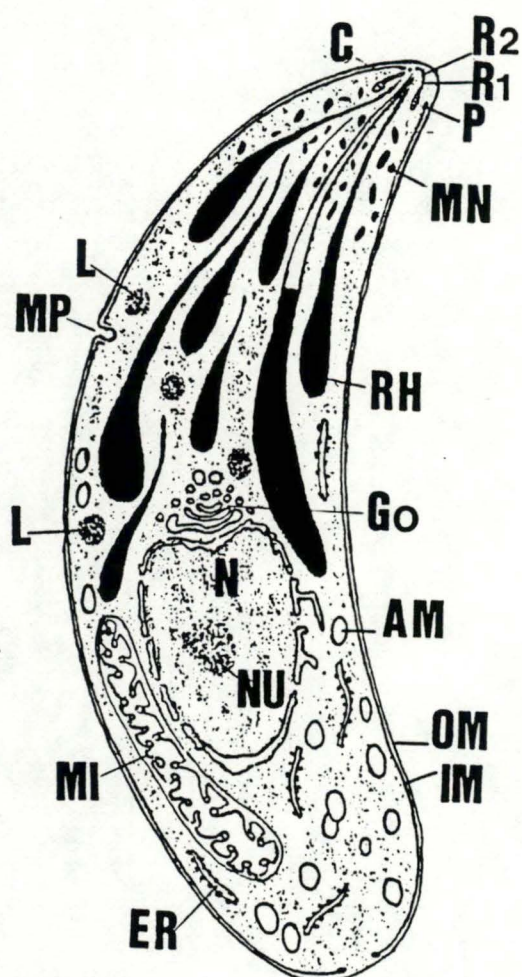
Sept espèces de toxoplasme sont décrites mais, seul le Toxoplasma gondii est responsable de la toxoplasmose. Il a une forme en croissant hétéropolaire de 4 à 8 μ m de longueur.

3.2. Morphologie du toxoplasme

Le toxoplasme est une coccidie qui existe sous 3 formes:

- une forme proliférative ou végétative: TROPHOZOITE
- une forme de résistance dans le milieu intérieur : KYSTE
- une forme de résistance dans le milieu extérieur : OOCYSTE

Le kyste et l'oocyste sont les 2 formes de dissémination du toxoplasme.



C	conoïde	AM	granule d'amylopectine
R1	anneaux préconoïdaux	OM	membrane externe
R2		IM	membrane interne
P	anneau polaire	MI	mitochondrie
MN	micronèmes	ER	réticulum endoplasmique
L	inclusions lipidiques	Go	appareil de Golgi
MP	micropore	N	noyau
RH	rhoptries	NU	nucléole

morphologie de Toxoplasma gondii

3.2.1. Le trophozoïte

Le trophozoïte ou tachyzoïte présente la forme classique "en croissant" (longueur 4 à 8 μ m, largeur 2 à 5 μ m). Dépourvu d'organes locomoteurs, il se déplace par contractions myofibrillaires. Il possède une formation apicale comprenant un complexe membranaire superficiel, un anneau polaire, un micropore, un conoïde, des micronèmes et des rhoptries qui sont les caractéristiques des Apicomplexa.

Le complexe membranaire superficiel : structure constante formée d'une membrane externe et d'un complexe membranaire interne séparés par un espace de 13 à 20nm d'épaisseur. La membrane externe est continue et englobe toute la cellule. Elle est conforme au type trilaminé classique. Le complexe membranaire interne est formé de 2 membranes interrompues dans la partie postérieure.

L'anneau polaire : est formé par le complexe membranaire interne épaissi et interrompu. C'est une structure auprès de laquelle prennent naissance 22 microtubules régulièrement distribués. Il semble jouer un rôle dans la contractilité et la mobilité.

Le micropore : est une invagination du complexe membranaire qui aurait un rôle nutritionnel.

Le conoïde : est une structure en forme de cône tronqué composée de 6 à 7 microtubules enroulés en spirale. Il faciliterait la pénétration du trophozoïte dans la cellule hôte; de plus, il est capable de phénomènes sécrétoires.

Les rhoptries:ont une forme de massue.

Les micronèmes : sont des petits organites situés dans la partie antérieure et pourraient faire partie du même système fonctionnel que les rhoptries.

../..

Le noyau : assez volumineux, se trouve dans la moitié postérieure du toxoplasme. L'appareil de Golgi est logé dans une cupule formée par sa partie postérieure.

Le cytoplasme contient dans la partie postérieure :

- 1 ou 2 mitochondrie(s) de grande taille
- des plages de glycogène
- des globules lipidiques
- des granules d'amylopectine.

Le réticulum endoplasmique est peu abondant.

La destruction de la membrane des formes de résistance (oocyste ou kyste) libère des trophozoïtes qui gagnent de manière transitoire le torrent circulatoire de l'hôte intermédiaire ou définitif.

La reproduction asexuée des trophozoïtes se fait dans les cellules épithéliales par schizogonie (endodyogenèse)*. Cette multiplication par division cellulaire se passe toutes les 4 à 6 heures.

- * Endodyogenèse : mode de division particulier dans lequel les 2 cellules filles se forment dans la cellule mère et leur membrane n'apparaît qu'au moment de la sortie de la cellule mère; elle est constituée par la membrane externe de cette dernière.

3.2.2. Le kyste

Le kyste a une forme sphéroïdale de 15 à 100 μ m. Entouré d'une membrane très résistante, élaborée par les microorganismes eux-mêmes, il renferme une multitude de toxoplasmes quiescents (bradyzoïtes) accolés les uns aux autres.

Les kystes sont intratissulaires et ont une grande longévité, comparable à celle des cellules qui les hébergent. Ils ne provoquent aucune réaction de défense de l'hôte.

3.2.3. L'oocyste

L'oocyste est un oeuf diploïde de 10 à 12 μ m entouré d'une coque très résistante; il résulte de la fusion des 2 types de gamètes lors de la reproduction sexuée (gamogonie). Sa formation est l'aboutissement du cycle entéro-épithélial se déroulant dans l'intestin de l'hôte définitif (le chat).

Sa maturation n'a jamais lieu dans l'intestin du chat car, elle demande des conditions suffisantes d'oxygène et d'humidité. De plus, elle est dépendante de la température.

Si l'environnement le permet, l'oocyste est le siège d'une sporulation conduisant à la forme infestante (sporozoïte) qui a la même structure que la forme végétative. Les sporocystes conservent leur pouvoir infestant pendant très longtemps car, ils sont résistants aux enzymes, aux alcalis, aux acides et aux détergents; par contre, ils résistent mal à la dessiccation et à la chaleur.

3.3. Cycle de vie

L'évolution de Toxoplasma gondii comprend 2 phases :

- une phase proliférative chez des hôtes intermédiaires non spécifiques (oiseaux, mammifères, y compris l'homme).
- une phase de reproduction dans l'intestin du chat qui apparaît comme l'hôte définitif (cycle entéro-épithélial).

3.3.1. Evolution chez l'hôte définitif : le chat.

Cycle de reproduction asexué ou schizogonie.

Le chat s'infeste en dévorant des rongeurs ou des oiseaux parasités par des kystes ou à partir d'oocystes mûrs souillant la terre, les herbes ou l'alimentation (légumes, fruits). Les stades de la schizogonie apparaissent sept jours après l'infestation. Dans l'intestin de l'animal, les kystes (ou les oocystes mûrs) donnent naissance à des trophozoïtes qui se multiplient par division cellulaire.

Cycle de reproduction sexué ou gamogonie.

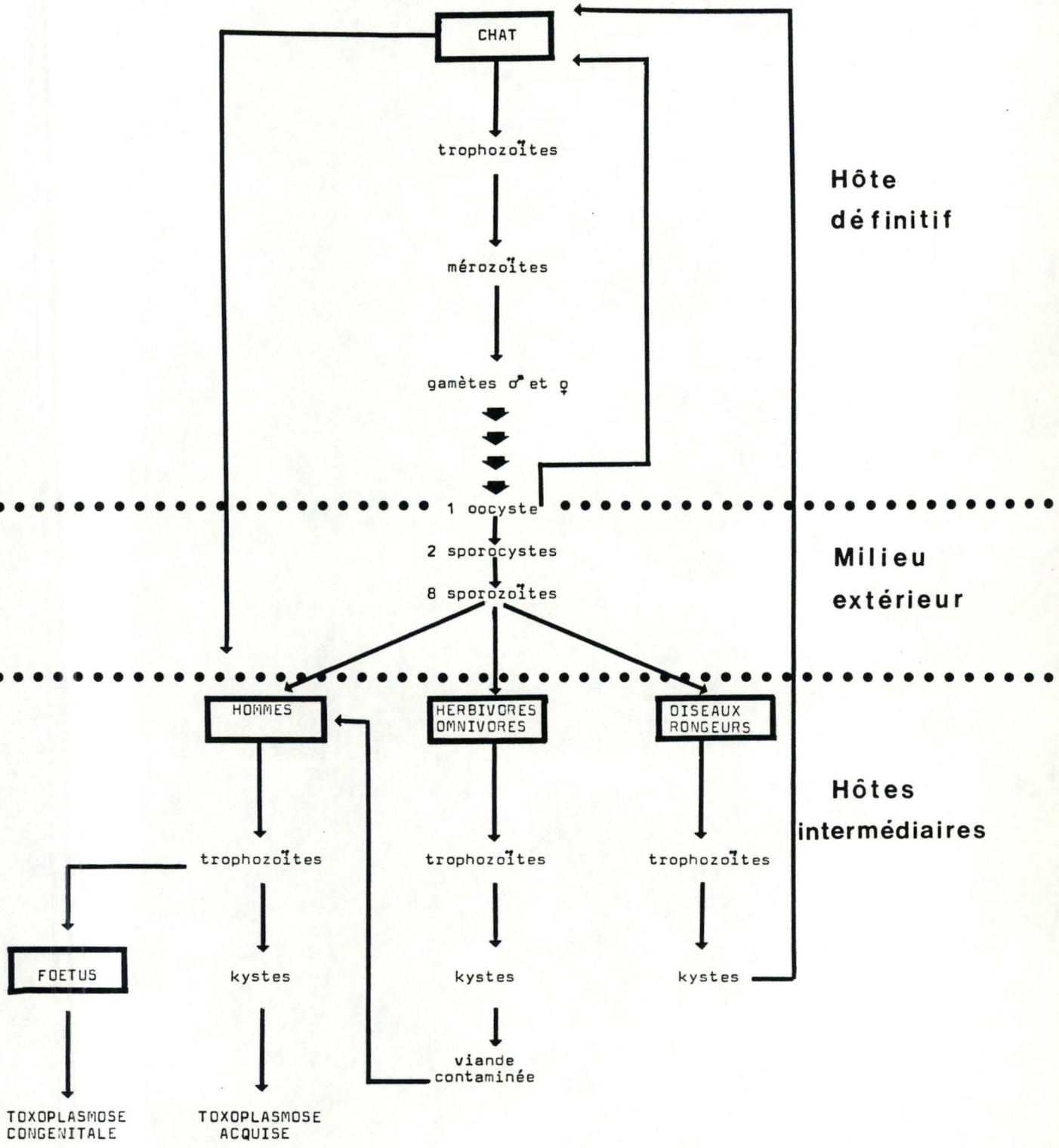
Dans les cellules de l'intestin, les trophozoïtes vont se "sexuer" et donner naissance à des microgamètes mâles et des macrogamètes femelles dont la fusion conduit à l'oocyste éliminé avec les fèces du chat.

L'oocyste n'atteint sa maturité que dans le milieu extérieur où l'on observe une sporulation, c'est-à-dire que naissent à l'intérieur de l'oocyste deux sporocystes elliptiques qui, à leur tour, renferment chacun quatre sporozoïtes (sporogonie).

3.3.2. Evolution chez les hôtes intermédiaires.

Les sporozoïtes ingérés sont libérés par destruction des membranes de l'oocyste mûr. Ils pénètrent dans les cellules hôtes et se multiplient pour conduire à une phase septicémique courte sous forme de trophozoïtes.

Rapidement, les trophozoïtes gagnent différents tissus (muscles ou le tissu nerveux), ils s'accrochent les uns aux autres, se multiplient et conduisent à la formation d'un kyste.



◆◆◆◆ : cycle sexué

Cycle de vie de TOXOPLASMA GONDII

IV. PATHOLOGIE HUMAINE

4.1. Introduction

La toxoplasmose est souvent asymptomatique. Les signes cliniques, quand ils existent, sont généralement protéiformes et, en conséquence, le diagnostic biologique a une valeur essentielle.

Chez l'homme, elle peut résulter de 3 modes de contamination:

- à partir de kystes, lors de l'ingestion de viande de boucherie (surtout porc et mouton) peu cuite. Ce mode de transmission est de loin le plus fréquent dans les pays à haut niveau de vie.
- à partir d'oocystes souillant la terre ou l'alimentation (fruits, légumes).
- à partir de trophozoïtes éventuellement contenus dans le sang, le lait, la salive, toutes sources d'infestation très exceptionnelles.

La toxoplasmose est variable suivant le pays et la région et est fonction du mode de vie, du niveau d'hygiène et des habitudes alimentaires.

4.2. Physiopathologie

L'évolution de la toxoplasmose passe par 3 phases caractérisées par des phénomènes parasitologiques, cliniques et biologiques particuliers.

Phase primaire :

Elle suit la contamination et correspond à une multiplication intracellulaire du parasite; celui-ci fait éclater les cellules du système réticulo-endothélial dans lesquelles il se réfugie. Progressivement, le taux d'anticorps protecteurs augmente, réduisant rapidement la parasitémie.

../..

../..

Phase secondaire :

Le sujet, renforçant son immunité humorale, les formes végétatives sont rapidement lysées. Seuls, des organes pauvres en anticorps (cerveau, oeil) sont le siège de multiplication parasitaire.

Phase tertiaire :

Ou phase de toxoplasmose chronique, elle correspond à la dissémination des formes kystiques dans les muscles et le tissu nerveux. Les kystes sont bien tolérés chez l'hôte; seule, une rupture de la membrane engendre des phénomènes inflammatoires locaux avec réaction immunologique d'hyper-sensibilité.

4.3. Les différentes formes cliniques de la toxoplasmose.

4.3.1. Toxoplasmose acquise.

En Europe, principalement en France et en Belgique, la toxoplasmose est une maladie du sujet jeune. Les formes bénignes sont, soit de type mononucléose infectieuse, soit de type polyadénopathies non fébriles. La guérison est généralement spontanée.

Les formes graves sont rares chez un individu sain et s'accompagnent d'atteinte hépatique, myocardique, péricardique et encéphalique. La chorioretinite est, dans la plupart des cas, une séquelle tardive d'une infection congénitale.

Biologie clinique : Leucocytose avec neutropénie et lymphocytose.

Eosinophilie élevée mais inconstante.

Cas particulier des hôtes immunodéprimés :

Chez les individus présentant un syndrome d'immunodépression provoqué ou acquis (SIDA), la toxoplasmose peut être gravissime, voire même mortelle; l'infection peut se faire soit en phase primaire, soit en phase tertiaire par réactivation d'une infection ancienne.

4.3.2. Toxoplasmose congénitale.

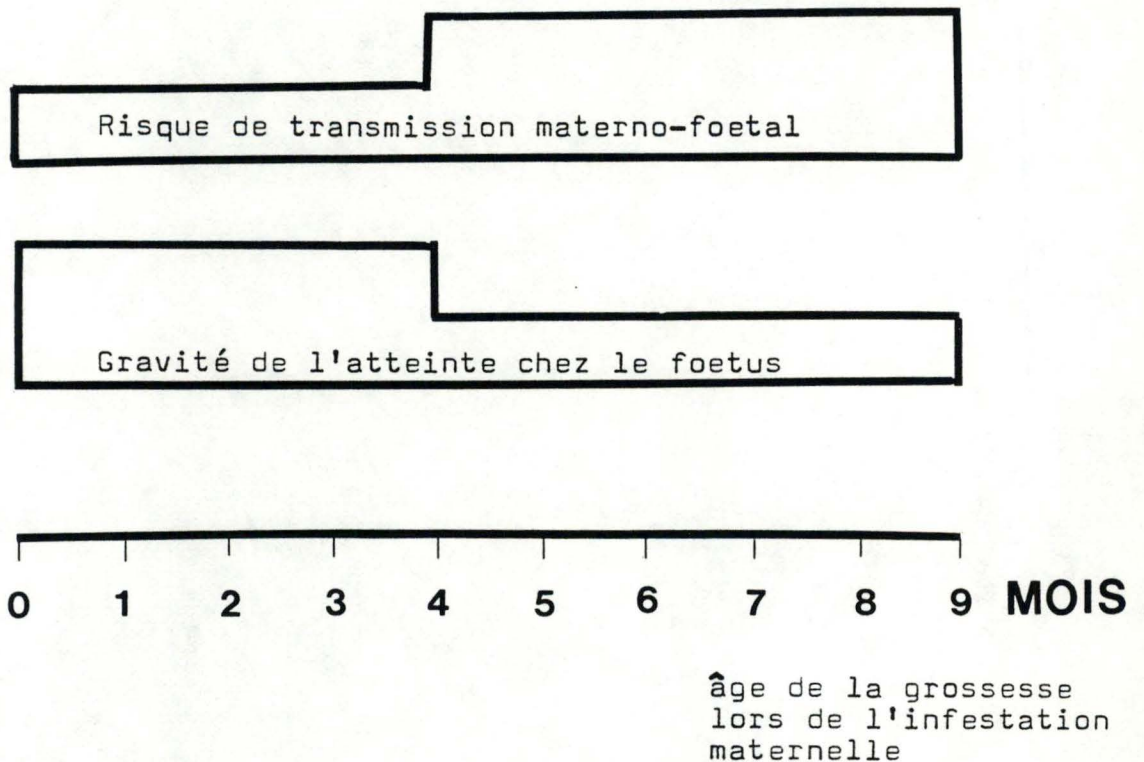
La toxoplasmose congénitale résulte du passage des trophozoïtes à travers le placenta, cependant :

- une femme immunisée avant sa grossesse ne pourra, en aucun cas, donner naissance à un enfant contaminé; il en va de même d'une infection contemporaine de la conception.
- une femme contractant une toxoplasmose au cours de la grossesse peut transmettre la maladie au foetus mais le passage transplacentaire n'est pas systématique. Indiscutablement, le risque existe et comporte des conséquences graves pour l'enfant; la surveillance biologique d'une femme séronégative s'impose donc au cours de sa grossesse. Des tests sérologiques sont réalisés le premier, le deuxième, le troisième, le cinquième, le septième et le neuvième mois.

Sur le plan immunitaire, 2 situations se présentent :

- soit le passage transplacentaire des IgG maternelles précède celui éventuel des trophozoïtes et peut retarder la réponse humorale du foetus.
- soit le passage transplacentaire des trophozoïtes précède celui des IgG spécifiques maternelles. La réponse immunitaire du foetus (au-delà de la 8^e semaine) semble plus complète dans ce dernier cas.

Ainsi, la gravité, la localisation et la date d'apparition des lésions chez le nouveau-né sont étroitement dépendantes des réponses immunitaires de la mère et de l'enfant.



Fréquence et conséquences de la transmission
materno-foetale dans la toxoplasmose contractée
en cours de grossesse.

D'une manière générale, plus la grossesse est évoluée, plus la transmission est fréquente et moins l'atteinte est grave (à l'exception des infections généralisées). La combinaison de ces 2 facteurs entraîne une période de risque maximal se situant entre la 10^e et la 24^e semaine, avec un maximum vers la 14^e semaine.

Il est classique de décrire 3 stades selon l'ancienneté de l'infestation de la mère au moment de l'accouchement.

.../...

Stade primaire : stade septicémique

L'infestation a eu lieu après le 6^e mois de la grossesse. Il est caractérisé chez le foetus par :

- des troubles viscéraux } lésions hépatiques
- } lésions cutanées
- une anémie et une érythroblastose sanguine.

Stade secondaire : stade de production des anticorps

L'infestation a eu lieu au cours du 3^e au 6^e mois de la grossesse. L'immunité humorale empêche le maintien de l'état septicémique. Par contre, les organes pauvres en anticorps constituent des cibles privilégiées, d'où la possibilité d'encéphalopathies avec hypotonies, contractures, crises convulsives et calcification cérébrale.

Stade tertiaire : stade kystique

L'infestation a eu lieu dans les 3 premiers mois de la grossesse. La totalité de la maladie s'est déroulée in utéro. A la naissance, ne subsistent que les signes de la phase tertiaire; l'atteinte foetale est grave et peut provoquer la mort in utéro.

Les séquelles sont des hydrocéphalies, des crises convulsives, des retards psychomoteurs, des encéphalopathies et des chorioretinites.

4.4. Traitement et prévention de la toxoplasmose.

Les mesures prophylactiques restent le plus sûr moyen de lutter contre la toxoplasmose chez les sujets à risque, comme la femme enceinte séronégative :

- prophylaxie quotidienne impliquant la cuisson rapide de tous les végétaux (oocystes détruits en 30 secondes à 90°C), la cuisson prolongée des viandes et le lavage des fruits. Les aliments congelés ne sont pas contaminants.
- prophylaxie sérologique impliquant une sérologie prénuptiale obligatoire, toute femme séronégative étant surveillée ensuite mensuellement pendant sa grossesse.
- la vaccination est toujours au stade expérimental.
- le traitement des sujets à risque est à base d'antibiotiques.

Traitement de la femme enceinte présentant une toxoplasmose évolutive : - Spiramycine (3g/jour) pendant 3 semaines traitement répété tout au long de la grossesse avec 2 semaines d'arrêt entre chaque cure.

Traitement de la toxoplasmose congénitale : 3 à 4 fois 20 jours

- Pyriméthamine (0,5 à 1mg/kg) et Sulfadiazine (50 à 100mg/kg tous les 2 à 4 jours
- injection intramusculaire d'acide folinique (5mg) tous les 2 à 4 jours

Entre les 2 cures: Spiramycine (100mg/kg) pendant 35 à 45 jours

Le traitement est en général stoppé à la fin de la première année de vie, car, l'enfant possède alors une immunité cellulaire suffisamment développée pour se défendre contre le toxoplasme.

V. IMMUNOLOGIE DE LA TOXOPLASMOSE.

5.1. Toxoplasma gondii : une mosaïque antigénique.

Le toxoplasme présente de nombreux antigènes de nature membranaire, cytoplasmique et métabolique qui ont été mis en évidence grâce à l'emploi d'anticorps monoclonaux.

La destruction du complexe membranaire par sonication a permis l'accessibilité aux antigènes solubles et des centrifugations différentielles permettent de les séparer des antigènes insolubles (membranaires).

La fraction S110 : contient les antigènes solubles, principalement de nature cytoplasmique et métabolique.

La fraction P110 : contient les antigènes insolubles et solubles.

La fraction P1 : contient les antigènes insolubles (membranaires)

5.2. L'immunité cellulaire.

L'immunité cellulaire joue un rôle majeur parmi les moyens de défense de l'organisme contre le toxoplasme. Elle apparaît entre 1 et 3 mois après l'infestation, et est ensuite entretenue par les toxoplasmes quiescents des kystes. Elle peut être mise en évidence par le "skin test" ou intradermo.

5.2.1. Son exploration.

Elle n'est pas réalisée en pratique courante. L'intradermo-réaction à la toxoplasmine, le test de transformation lymphoblastique (TTL) et le test d'inhibition de migration des macrophages (MIF) peuvent être utilisés. Les interprétations de ces tests sont délicates.

5.3. L'immunité humorale.

L'immunité humorale joue un rôle moins important mais les anticorps sont un témoin plus précoce de l'infection, puisqu'ils sont décelés dès la fin de la première semaine suivant la contamination.

Les méthodes de routine biologique sont toutes basées sur la recherche d'une immunité humorale contre Toxoplasma gondii; elles reposent sur la mise en contact in vitro d'antigène toxoplasmique et du sérum humain à tester de manière à mettre en évidence la présence d'anticorps spécifiques.

Pour bien comprendre l'intérêt et la signification d'un sérodiagnostic toxoplasmique, il est nécessaire de connaître trois points fondamentaux :

- L'homme infesté par les trophozoïtes élabore, en premier lieu, des anticorps spécifiques dirigés contre la membrane ensuite seulement, contre les constituants cytoplasmiques du parasite.
- Les premières immunoglobulines secrétées sont de type IgM, suivies d'immunoglobulines de type IgG. Ces dernières subsisteront à vie dans le sang.
- Le toxoplasme est une véritable mosaïque antigénique. Dans cette mosaïque, certains antigènes hétérogéniques sont ubiquitaires et reconnus par des anticorps "naturels" de type IgM. Cette réaction peut donner des résultats faussement positifs.

5.3.1. Son exploration.

Les tests réalisés en laboratoire contrôlent l'immunité toxoplasmique acquise et les diagnostics reposent essentiellement sur des méthodes immunologiques détectant les anticorps circulants de différentes classes. Certaines techniques utilisent des antigènes constitués par la cellule parasitaire entière (Dye test, immunofluorescence, agglutination) et d'autres, des antigènes extraits par lyse du toxoplasme (ELISA - hémagglutination - fixation du complément). Le choix des techniques doit tenir compte de leur spécificité, de leur sensibilité qui conditionne d'ailleurs la précocité de la détection des anticorps à taux faible et de leur reproductibilité.

Le profil sérologique résultant de l'exploration de l'immunité humorale est différent d'une étape à l'autre de l'infection chez un même sujet, mais il peut l'être aussi, d'un sujet à l'autre, au même stade de leur infection.

5.3.1.1. Le Dye test de Sabin et Feldman (DT)

Cette méthode ancienne reste la technique de référence du fait de sa spécificité et de sa sensibilité.

Principe : Des toxoplasmes vivants sont mis en contact avec du "facteur accessoire" et des dilutions du sérum décomplémenté. La présence d'anticorps complexés à la surface du toxoplasme active le complément qui lyse la membrane cellulaire et tue les parasites.

L'observation se fait :

- soit en microscopie classique en présence de bleu de méthylène. Le toxoplasme altéré devient non colorable (Dye test: test tinctorial).
- soit en microscopie à contraste de phase où le toxoplasme mort perd sa réfringence.

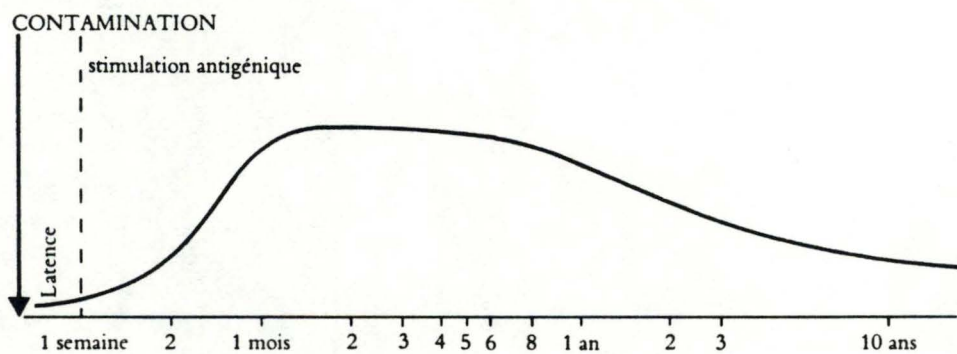
../..

Antigènes utilisés : Toxoplasmes intacts, vivants.

Anticorps détectés : Ce sont principalement les Ig sériques qui apparaissent lors de la période courte de prolifération des trophozoïtes et qui sont dirigées contre les antigènes membranaires.

Cinétique des anticorps

détectés : La réponse détectée est très précoce (8 à 20 jours après le début de l'infection) Elle est maximale au bout de 1 à 2 mois, décroît lentement mais se maintient à vie.



Seuil de spécificité : 2 à 5 UI/ml

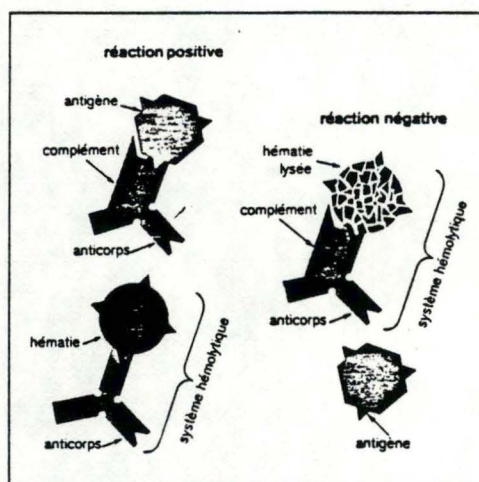
- Limites :
- nécessité d'entretenir une souche de toxoplasmes
 - la difficulté du choix du "facteur accessoire" (sérum de cobaye)
 - le coût
 - le danger lors des manipulations
 - détecte seulement les Ig globales
 - ce test ne tient pas compte des Ig des classes IgA et IgG 4.

5.3.1.2. La réaction de fixation du complément (RFC)
de Warren et Sabin.

Cette méthode prend toute sa valeur dans le diagnostic d'une toxoplasmose évolutive.

Principe : Lors du premier temps de la réaction, la mise en présence d'anticorps spécifiques et de l'antigène détermine la formation d'un complexe qui fixe la quantité précisément déterminée de complément (c') introduite dans la réaction. Le mélange hémolytique (globules rouges de mouton + anticorps anti-globules rouges de mouton), introduit dans un deuxième temps, visualise cette réaction :

il n'y a pas d'hémolyse si le c' est fixé lors du premier temps. Inversément, si le c' est resté libre lors du premier temps (absence d'anticorps), il y a une hémolyse.



Antigènes utilisés : Ce sont des antigènes cytoplasmiques solubles obtenus par des procédés physico-chimiques.

Anticorps détectés : IgG (sauf sous-classe IgG4) et IgM qui fixent le complément.

Cinétique des anticorps

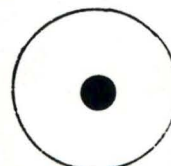
détectés : La réponse détectée est retardée par rapport au Dye test. Cette méthode peut être utile pour suivre une séroconversion.



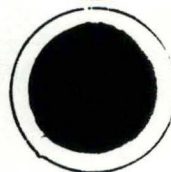
Seuil de spécificité : Dilutions de 1/8 à 1/32 suivant l'antigène utilisé.

Lecture :

réaction positive



réaction négative



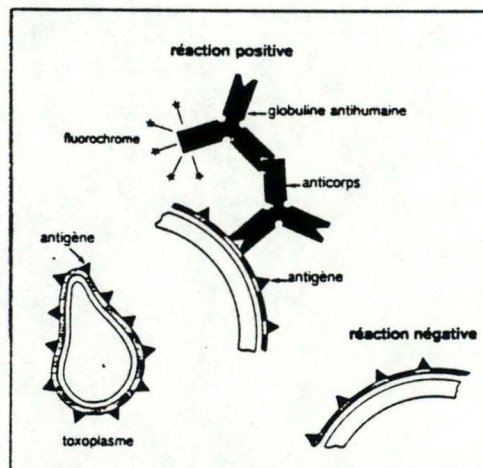
Limites :

- Ce test ne révèle pas la présence d'anticorps n'activant pas le complément (IgA, IgE, IgG4)
- Il n'est pas significatif lorsque le sérum à titrer possède un effet anti-complémentaire (immunoglobulines agrégées: présence d'ICC, sérums contaminés, sérums lipémiques, sérums vieillis), le rendant positif de manière non spécifique.

5.3.1.3. Immunofluorescence indirecte (IFI) de Goldman.-----

Ce test est le plus utilisé dans les laboratoires car la technique est aisée, économique, spécifique et les résultats sont reproductibles.

Principe : On met en présence, sur lame, l'antigène toxoplasmique et le sérum humain contenant les anticorps puis on révèle les anticorps fixés sur cet antigène par une globuline anti-humaine marquée à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC)

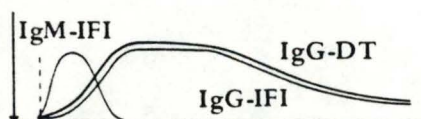


Antigènes utilisés : Ce sont des antigènes complets avec une prédominance des antigènes membranaires.

Anticorps détectés : Ig totales, IgG ou IgM selon l'anti-immunoglobuline utilisée.

Cinétique des anticorps

détectés : La courbe d'évolution des IgG est superposable à celle rencontrée dans le Dye test. Ce test permet la détection précoce des anticorps membranaires et la mise en évidence de l'immunité protectrice d'un sujet.



Seuil de spécificité : IgG : 10 UI/ml

Lecture : Réactions positives : les sérums qui donnent une fluorescence de toute la paroi du parasite.

Réactions négatives : les sérums qui ne donnent pas une fluorescence de toute la paroi du parasite ou une fluorescence polaire (mono ou bipolaire).

5.3.1.3.1. Le test de Remington.

Ce test utilise le même principe que l'immunofluorescence mais il met en évidence les IgM avec un seuil de spécificité de 40 à 50 (inverse de dilution).

Limites : - défaut de sensibilité lorsque les IgM sont peu élevées.

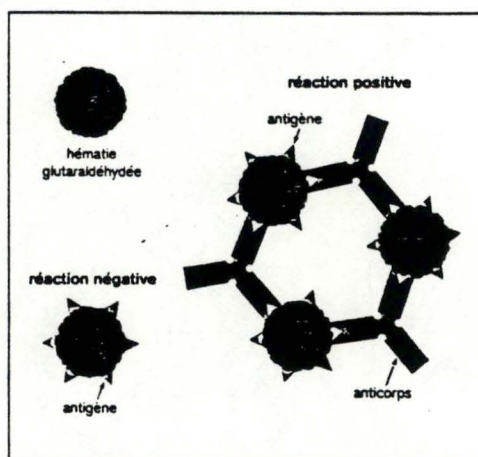
- négativation trop précoce lorsque les IgG sont en quantité suffisante pour bloquer la fixation des IgM moins avides (compétition IgG - IgM).

(voir 10.9.)

5.3.1.4. L'hémagglutination indirecte (HAI).

C'est une technique très utilisée parce qu'elle est complémentaire de l'immunofluorescence. Des particules telles que des globules rouges d'animaux stabilisés (ou des billes de latex) sont sensibilisées avec des antigènes toxoplasmiques.

Principe : Des globules rouges d'animaux stabilisés et sensibilisés avec des antigènes toxoplasmiques sont mis en contact avec un échantillon sérique. La présence d'anticorps se traduit par un phénomène d'hémagglutination.



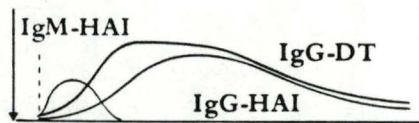
Antigènes utilisés : Ce sont des antigènes solubles mixtes, c'est-à-dire des antigènes membranaires et cytoplasmiques.

Anticorps détectés : Ce sont surtout des IgG. Cependant, il est possible de mettre en évidence indirectement la présence d'IgM antitoxoplasmiques après traitement de l'échantillon au 2 mercaptoéthanol (2ME) qui dépolymérise les IgM.

Cinétique des anticorps

détectés : Elle est étroitement liée à la composition de la préparation antigénique :

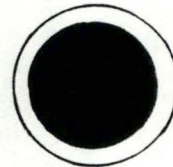
- Lorsque cette dernière ne comprend que des éléments cytoplasmiques, les anticorps révélés seront ceux produits plus tardivement après le début de l'infection. Ce type de méthode est un bon reflet d'une immunité plus ancienne.
- La présence d'antigènes membranaires permet une détection plus précoce mais, dans ce dernier cas, la technique est plus sensible aux anticorps naturels.



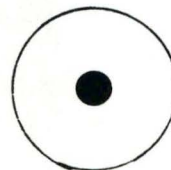
Seuil de spécificité : IgG : 1/40

Lecture :

Réaction positive



Réaction négative



Limite : Les anticorps naturels peuvent réagir avec certains constituants des hématies.

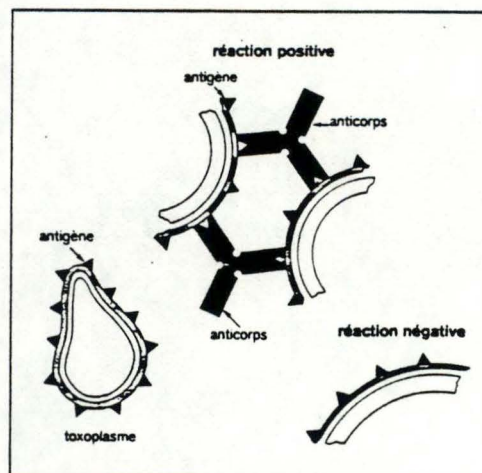
5.3.1.5. L'agglutination directe (AD)

Cette technique est simple, d'une grande sensibilité et spécifique pour les examens de dépistage des IgG. Les résultats sont comparables à ceux du test de lyse.

Le test avec ou sans traitement des sérums au 2ME situe le stade évolutif de la maladie.

Principe : Des toxoplasmes entiers formolés sont agglutinés lorsqu'ils sont mis en présence de sérums contenant des anticorps spécifiques.

L'emploi d'un tampon de dilution au 2 mercaptoéthanol permet d'affirmer la présence d'IgG spécifiques si l'on constate une réaction positive. La recherche des IgM spécifiques devra s'effectuer par une autre technique (immunofluorescence, ELISA).

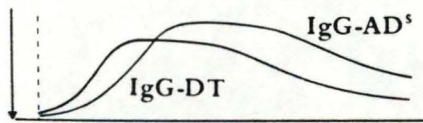


Antigènes utilisés : Comparables à ceux utilisés en immunofluorescence, ils correspondent au toxoplasme entier avec une prédominance des antigènes membranaires.

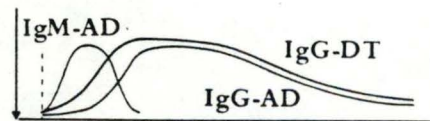
Anticorps détectés : Détection des IgG spécifiques dirigées essentiellement contre la membrane.

Cinétique des anticorps

détectés : Méthode très proche du Dye test. La haute sensibilité de ce test aux IgM en fait une méthode de choix dans l'exploration de la toxoplasmose congénitale acquise évolutive. Le traitement de l'échantillon sérique au 2 ME permet la mise en évidence des IgG spécifiques seules.



antigène sensibilisé



antigène formolé

Seuil de spécificité : dilution 1/8 (stable au 2 ME)

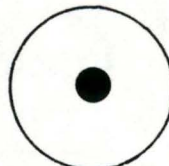
Lecture :

Réaction positive



sédimentation en "voile" si présence d'anticorps toxoplasmiques

Réaction négative



sédimentation en "bouton" si absence d'anticorps toxoplasmiques

- Limites : - Sensible aux anticorps naturels; ce qui provoque des réactions non spécifiques.
- Après traitement au 2 ME, certains sérums contenant des IgG agrégées peuvent donner des titres erronés.

5.3.1.6. Les réactions immunoenzymatiques.

5.3.1.6.1. ELISA (enzyme linked immunosorbent assay)

Cette technique est très spécifique et plus sensible que l'immunofluorescence. La comparaison des 3 taux (IgG totales, IgG, IgM) définit l'état sérologique du malade.

Elle est exposée à moins de risques d'erreurs par défaut. Par ailleurs, comme la technique est finalement une méthode de "sandwich" comme l'immunofluorescence indirecte, le test ELISA devrait être exposé à des risques d'erreurs par excès liés à la présence du facteur rhumatoïde. En pratique, ce phénomène intervient très peu en raison, soit de la très grande sensibilité de la méthode, soit du pH acide auquel une partie de la réaction est réalisée.

Principe : Les antigènes toxoplasmiques, fixés sur un support solide, sont incubés avec le sérum. Les anticorps spécifiques présents se fixent sur la préparation antigénique et sont mis en évidence par des anti-IgG ou anti-IgM humaines marquées avec une enzyme et révélées à leur tour par hydrolyse d'un substrat chimique.

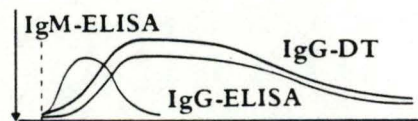
Antigènes utilisés : Ce sont des antigènes solubles proches de ceux utilisés pour les réactions d'hémagglutination, riches en antigènes cytoplasmiques et renfermant des quantités variables d'antigènes membranaires.

Anticorps détectés : IgG ou IgM selon les conjugués enzymatiques utilisés.

Cinétique des anticorps
détectés

: L'utilisation d'antigènes solubles cytoplasmiques entraîne une détection retardée des IgG par rapport au Dye test. Les IgM sont généralement détectées précocement en raison de la sensibilité de la technique.

L'utilisation d'antigènes membranaires purifiés permettrait une détection plus précoce des IgG.



Limite : Les résultats varient en fonction de l'antigène utilisé.

Parmi les techniques décrites, à l'exception de la technique de référence, il peut exister des difficultés analytiques de type :

- faux-négatifs IgM par compétition de fixation entre les IgG et les IgM spécifiques.
- faux-positifs IgM par interférence possible du facteur rhumatoïde.

Réactions faussement positives.

Il existe des risques d'erreurs par excès de par la présence dans le sérum à étudier de facteurs rhumatoïdes et d'anticorps anti-nucléaires. Il convient de rechercher systématiquement la présence de facteurs rhumatoïdes dans tout sérum trouvé positif en IgM par immunofluorescence.

Si cette recherche est positive, le sérum est absorbé sur des particules de latex sensibilisées par des IgG humaines ou animales qui éliminent les facteurs rhumatoïdes, puis on répète le test d'IF (IgM) dont l'éventuelle positivité traduit alors la présence d'IgM spécifiques du toxoplasme.

Réactions faussement négatives.

Des risques d'erreurs par défaut sont possibles. Une inhibition due à la compétition avec les IgG présentes dans les sérums de titres élevés en IgG (>1280 UI/ml) explique la négativation très rapide de l'IF IgM chez des sujets infestés depuis moins de 3 mois.

Une technique de précipitation des IgG par un antisérum (origine de lapin) en présence de PEG, permet une sensibilisation de la technique pour les IgM tout en éliminant le facteur rhumatoïde.

Aussi, certains auteurs ont-ils cherché à s'affranchir de ce problème en proposant des solutions diverses pour la détection des IgM spécifiques. Le principe de ces tests repose sur la fixation d'anti-IgM humaines sur un support solide permettant la capture des IgM éventuellement contenues dans l'échantillon sérique analysé. Les tests sont différents selon le procédé de révélation des IgM toxoplasmiques.

5.3.1.6.2. IgM ISAGA (IgM immunosorbent Agglutination assay)

Principe : Immunocaptation des IgM du patient par un sérum anti-IgM humaine. Après l'addition de l'antigène, l'aspect de la sédimentation diffère : voile, en présence d'anticorps spécifiques; bouton, en leur absence. La révélation se fait avec l'antigène sensibilisé de l'agglutination directe.

Limite : Nécessité d'un étalonnage très précis: la réaction n'est spécifique qu'au-delà du seuil d'immuno-adsorption des anticorps "naturels".

5.3.1.6.3. Reverse ELISA et double sandwich ELISA.

La révélation se fait, soit directement par un antigène toxoplasmique marqué par une enzyme, soit indirectement par un couple antigène toxoplasmique/anticorps toxoplasmique marqué par une enzyme.

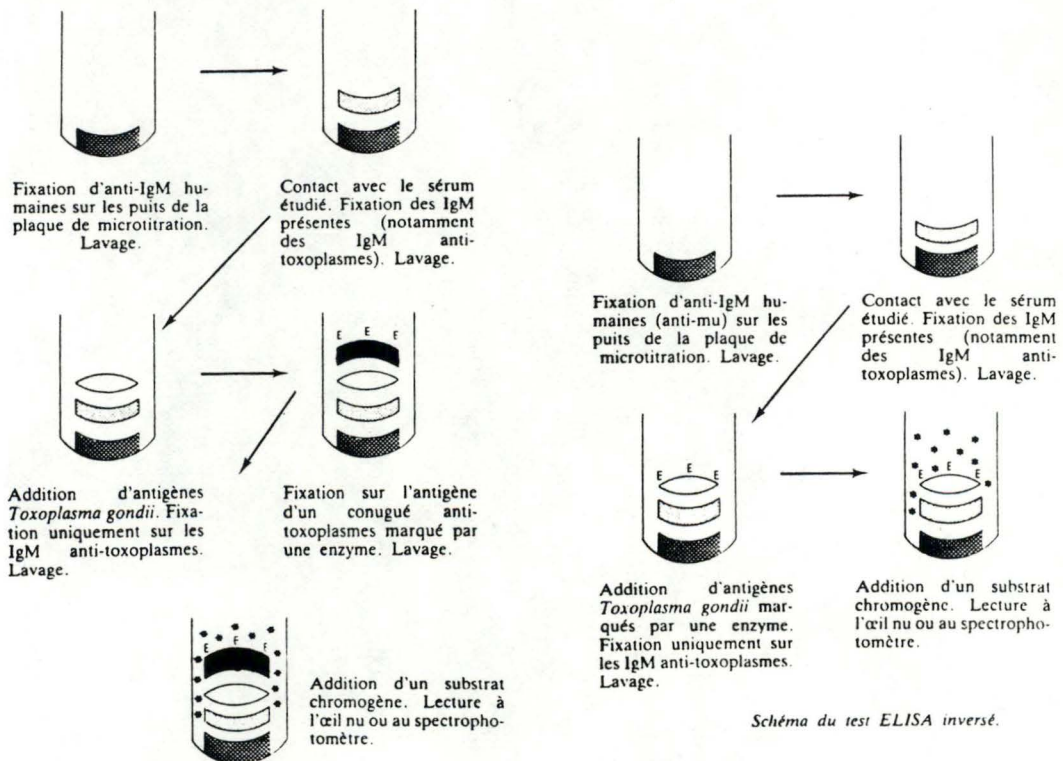


Schéma du test ELISA « double sandwich ».

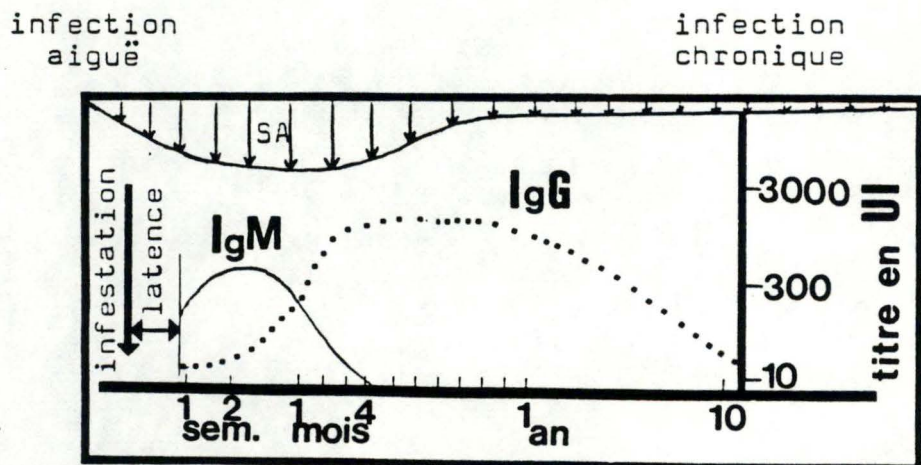
5.4. Cinétique des anticorps toxoplasmiques.

La stimulation antigénique (SA) s'accroît pendant la phase de latence (invasion parasitaire), puis se stabilise et régresse au fur à mesure que l'hôte s'immunise.

Cette phase de latence, d'environ une semaine, suit l'infestation. L'immunité est entretenue par la persistance des parasites au stade chronique. Les premiers anticorps, de la classe IgM (19S) apparaissent et leur taux atteint un maximum vers la 2^e ou 3^e semaine d'infection, puis régresse. Ils persistent en moyenne moins de 4 mois; mais, il y a d'importantes variations individuelles : de 2 semaines à 2 ans^{1/2}. Les IgM naturelles sont toujours présentes.

Les anticorps IgG ne sont décelés que vers le 14^e jour après l'infestation. Leur taux atteint un maximum vers la fin du 2^e mois, reste en plateau (300 à 3000 UI/ml) quelques mois, puis régressent jusqu'à un taux résiduel de 15 à 200 UI/ml persistant de nombreuses années, sinon toute la vie.

Dans certains cas, des IgE spécifiques sont détectées lors de la phase aiguë de la maladie. De plus, cette phase est caractérisée par une chute du C₃ et du C₄ par rapport aux valeurs normales.



Evolution des anticorps toxoplasmiques

5.5. Interprétation sérologique de la toxoplasmose acquise.

Une demande de sérologie traduit le besoin de savoir s'il y a ou non une toxoplasmose, mais surtout si l'infection est actuelle ou passée, c'est-à-dire si elle nécessite ou non un traitement. Les anticorps, pouvant persister presque toute la vie, un seul titrage ne permet que de répondre à la première question, mais en aucun cas de juger de l'évolutivité de l'affection, excepté dans le cas d'une présence simultanée d'anticorps IgG et IgM. Un deuxième test 15 à 20 jours plus tard le permettra.

Les résultats sérologiques sont exprimés en unités internationales (UI/ml) par rapport à un sérum étalon de l'OMS.

	I.F.	I.F. REMINGTON (antiglobuline, anti-IgM)	HÉMAGGLUTINATION		AGGLUTINATION		R.F.C.	SIGNIFICATION	RISQUE FCETAL	TRAITEMENT DE LA FEMME ENCEINTE	
			sérum non-traité	sérum traité au 2 M.E.	sérum non traité	sérum traité au 2 M.E.					
1er CAS	S 1	< 10 UI	Négatif	< 1/40	< 1/40	< 1/8	< 1/8	< 1/8	<p>Il n'y a pas d'immunité acquise. C'est-à-dire qu'il n'y a pas eu de contamination. La femme peut contracter la maladie. En effet, il n'y a ni IgG ni IgM.</p> <p>1/ Si la femme n'est pas enceinte</p> <p>2/ Si la femme est enceinte : a/ Veiller à ce que la viande ingérée soit bien cuite. Interdire l'ingestion de crudités (végétaux). Eloigner les chats de son foyer. b/ Redemander des sérologies périodiquement au cours de la grossesse (une fois par mois).</p>	NON	NON
	S 2	< 10 UI	Négatif	< 1/40	< 1/40	< 1/8	< 1/8	< 1/8		POTENTIEL	NON
2e CAS	S 1	De 10 UI à 330 UI	Négatif	Du 1/40 au 1/2560	Titre identique	Du 1/8 au 1/64	Titre identique	Négatif au 1/32	<p>Immunité ancienne : En effet le taux des IgG est élevé. Il n'y a plus d'IgM. Conduite à tenir : Aucune précaution particulière. La femme ne court aucun risque pour elle ou pour son enfant.</p>	NON	NON
	S 2	De 10 UI à 330 UI	Négatif	Du 1/40 au 1/2560	Titre identique	Du 1/8 au 1/64	Titre identique	Négatif au 1/32		NON	NON
3e CAS	S 1	10 UI	Positif > 1/40	> 1/40	Négatif	> 1/32	Négatif	1/32	<p>Toxoplasmose récente en cours d'évolution.</p> <p>1/ Si la femme n'est pas enceinte</p> <p>2/ Si la femme est enceinte : Se pose alors le problème de la date de survenue de l'infection toxoplasmique par rapport à la date de début de grossesse. La comparaison des deux sérologies s'avère très intéressante. S1 < S2 en immunofluorescence : présence des IgM. S1 < S2 : augmentation des taux d'hémagglutination et d'agglutination. Donc sérologie " évolutive " = contamination récente datant d'environ deux mois puisque les IgM sont encore présentes.</p>	NON	NON
	S 2	165 UI	Positif > 1/40	1/640	1/40	1/256	1/16	1/128		OUI	OUI
4e CAS	S 1	330 UI	Négatif	1/2560	Stable	1/128	Stable	1/64	<p>Toxoplasmose clinique. Maladie évolutive dont le début remonte à quelques mois (plus de 3 mois).</p> <p>1/ La femme n'est pas enceinte : Pas de risque. La femme est en train d'acquies une bonne immunité.</p> <p>2/ La femme est enceinte : S1 - S2 : Pour toutes les méthodes. Les taux sont importants avec toutes les méthodes. Par ailleurs, les IgM ont déjà disparu ; donc il s'agit d'une contamination remontant à plusieurs mois. Pas de risque fœtal.</p>	NON	NON
	S 2	330 UI	Négatif	1/2560	Stable	1/128	Stable	1/64		NON	OUI Par Spiramycine en 2 cures de 3 semaines espacées par 8 jours de repos
5e CAS	S 1	150 UI	Négatif	1/320	1/320	1/16	1/16	1/8	<p>Immunité ancienne</p> <p>Rebond physiologique (grossesse)</p> <p>La femme a une bonne immunité acquise depuis longtemps. Cette immunité est réactivée par la libération d'antigènes (kystes rompus dans le muscle utérin).</p>	NON	NON
	S 2	150 UI	Négatif	1/320	1/320	1/16	1/16	1/8		NON	NON
	S 3	750 UI	Négatif	1/10240	1/10240	1/1024	1/1024	1/32		NON	NON

* NB S1 et S2 à 15 jours d'intervalle

interprétation sérologique de la toxoplasmose acquise

		I.F.	REMINGTON (antiglobuline, anti-IgM)	HÉMAGGLUTINATION		AGGLUTINATION		R.F.C.	SIGNIFICATION	CONDUITE A TENIR
				sérum non-traité	sérum traité ou 2 M.E.	sérum non-traité	sérum traité ou 2 M.E.			
1 ^{er} Cas	Sang du cordon	165 UI	1/80	1/160	1/80	1/64	1/16	1/32	Toxoplasmose congénitale évolutive En effet, le taux des IgG augmente entre la naissance et le quatrième mois avec les IgM positives. A partir du quatrième mois, les IgM ont disparu.	TRAITEMENT +
	Sérologie 1 mois	165 UI	1/80	1/160	1/80	1/64	1/16	1/32		
	Sérologie 4 mois	300 UI	N	1/320	1/320	1/64	1/64	1/16		
2 ^e Cas	Sang du cordon	165 UI	N	1/160	1/160	1/64	1/64	1/32	Toxoplasmose congénitale évolutive En effet le taux des IgG augmente entre la naissance et le quatrième mois. Les IgM sont absentes, car elles ont déjà disparu.	TRAITEMENT +
	Sérologie 1 mois	300 UI	N	1/80	1/80	1/64	1/64	1/8		
	Sérologie 4 mois	1000 UI	N	1/320	1/320	1/64	1/64	1/16		
3 ^e Cas	Sang du cordon	300 UI	N	1/1280	1/1280	1/128	1/128	1/8	Pas de toxoplasmose congénitale En effet le taux des IgG diminue entre la naissance et le quatrième mois. Il s'agit donc des IgG d'origine maternelle transmises passivement au fœtus par voie transplacentaire.	PAS DE TRAITEMENT
	Sérologie 1 mois	300 UI	N	1/640	1/640	1/64	1/64	1/8		
	Sérologie 4 mois	10 UI	N	1/80	1/40	1/8	1/4	N		

3^e S en cours de grossesse (3 à 4 mois après)

5.6. interprétation sérologique de la toxoplasmose chez le nouveau-né (dans le cas d'une séro-conversion durant la grossesse).

5.6.1. Les immunoglobulines chez le fœtus et le nouveau-né.

En plus du transfert passif d'IgG maternelles, il existe une production d'Ig propres au fœtus, qui sont importantes dans le diagnostic d'une toxoplasmose congénitale.

5.6.1.1. Transfert passif d'IgG maternelles.

Parmi les 3 groupes essentiels d'Ig (IgA, IgM, IgG), seules les IgG traversent la barrière placentaire. On les retrouve dès le 3^e mois de la vie fœtale. Leur taux, fonction du taux d'IgG maternelles, augmente progressivement au cours de la gestation pour atteindre et parfois dépasser à la naissance celui de la mère.

5.6.1.2. Production d'Ig fœtales.

Il est prouvé actuellement, de manière indiscutable, que le fœtus est capable de synthétiser ses propres anticorps. Il produit des IgG, des IgM et même des IgA. Cette preuve de la synthèse a été apportée par la mise en évidence d'IgG dont les groupes Gm étaient identiques à ceux du père et absents chez la mère.

Dans la toxoplasmose congénitale, des anticorps spécifiques de la classe des IgM sont retrouvés chez le fœtus dès le 5^e mois de la gestation. Les IgM ne traversant pas la barrière placentaire, ces anticorps ne peuvent être que d'origine fœtale. Leur présence dans le sérum du nouveau-né doit donc être considérée comme signe d'une toxoplasmose congénitale et doit faire établir immédiatement un traitement spécifique, sans attendre l'évolution sérologique dans le temps.

VI. RESOLUTION DE L'ANTIGENE TOXOPLASMIQUE EN PAGE SDS

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide SDS (SDS-PAGE) a été introduite par Shapiro, Vinuela et Maizel comme une technique de détermination des poids moléculaires de protéines. Cette technique est devenue une des plus utilisées dans les méthodes de séparation des molécules biologiques.

Cette électrophorèse est :

- d'une grande maniabilité
- d'une bonne résolution
- d'une bonne reproductibilité.

Le gel de polyacrylamide :

- est transparent aux concentrations en acrylamide les plus utilisées.
- est flexible et résistant à la fois.
- présente un bon pouvoir de séparation.
- présente un phénomène d'électroendosmose négligeable.

Pour cette raison, la préférence est accordée au gel de polyacrylamide; en effet, le gel d'agarose sépare seulement les protéines suivant leur charge.

6.1. Les antigènes.

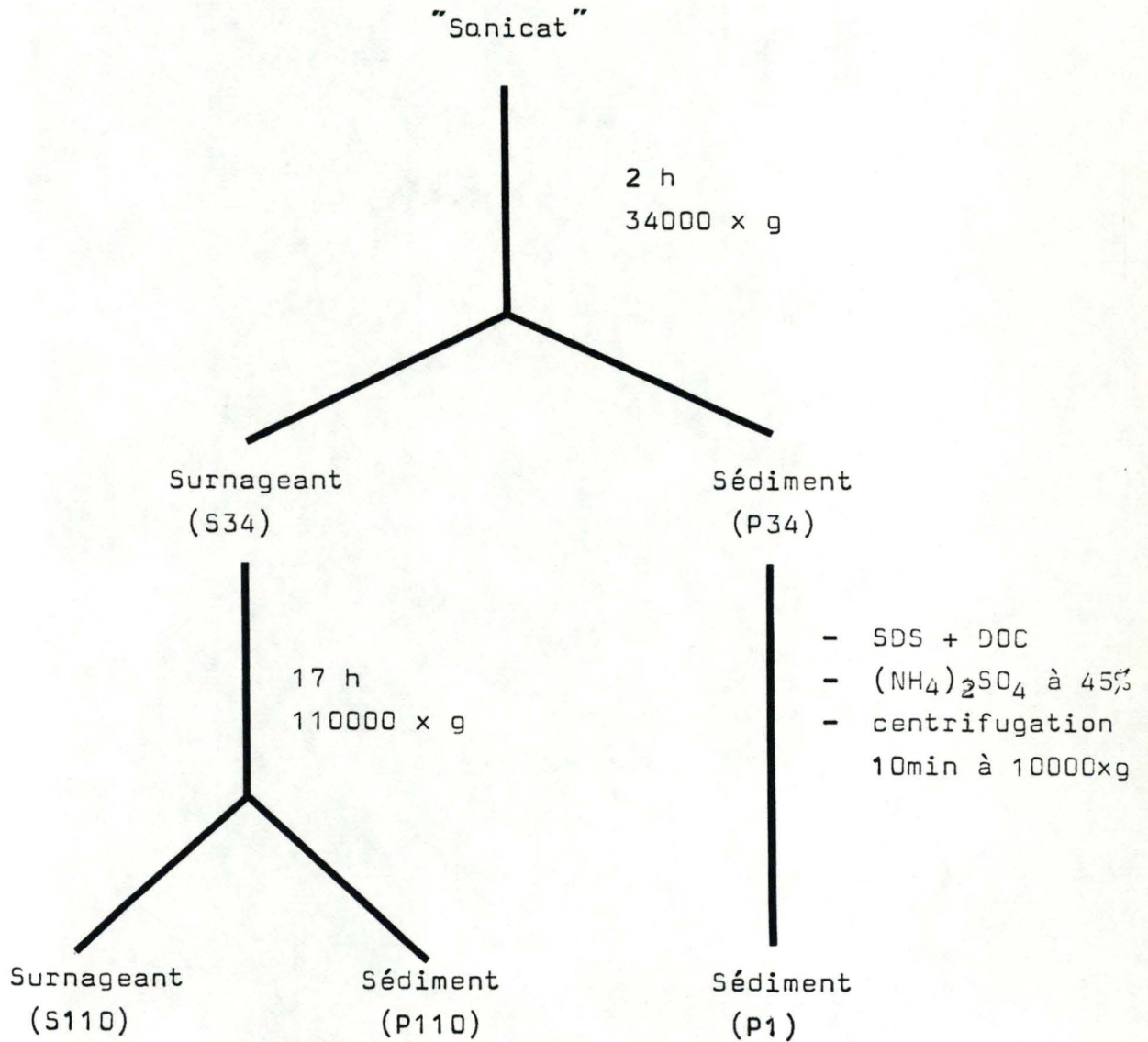
6.1.1. Multiplication de la souche.

Les trophozoïtes sont obtenus à partir d'un exsudat péritonéal d'une souris infectée 4 jours auparavant avec une souche de Toxoplasma gondii par inoculation intrapéritonéale. Cet exsudat est centrifugé pendant 20 min à 2000 x g et les trophozoïtes sont lavés 3 fois avec une solution de NaCl 0,9%. Le culot est resuspendu dans du PBS et est passé aux ultrasons pendant 5 min; il est conservé à -70°C. La rupture membranaire permet l'accessibilité aux antigènes cytoplasmiques et métaboliques.

6.1.2. Traitement des antigènes toxoplasmiques.

6.1.2.1. L'ultracentrifugation.

Les trophozoïtes soniqués sont soumis à des ultracentrifugations différentielles afin de séparer les antigènes solubles des antigènes membranaires selon le schéma suivant :



.../...

Le sédiment (P 34) obtenu après centrifugation à 34000 x g est solubilisé dans une solution de 0,5mg SDS et 2 mg de déoxycholate (DOC) par mg de protéines, dialysé contre du PBS et est soumis à une précipitation au sulfate d'ammonium à 45%.

Après une centrifugation pendant 10 min à 10000 x g, le sédiment (P1) est récupéré et mis en solution dans le tampon TRIS pH 8,35 SDS 0,2% (200 μ l)

6.1.2.2. Préparation pour la migration.

Les antigènes des trophozoïtes sont dilués au 1/3 dans du sucrose 10% et du SDS 2%. Nous ajoutons 25 μ l de bleu de bromophénol pour suivre le front de la migration.

La solution est chauffée à 45°C pendant 10 min afin que toutes les protéines soient enrobées de charges négatives du SDS. Nous déposons 1,5 ml sur le gel afin d'obtenir une quantité suffisante d'antigènes.

6.2. Préparation du gel de polyacrylamide SDS

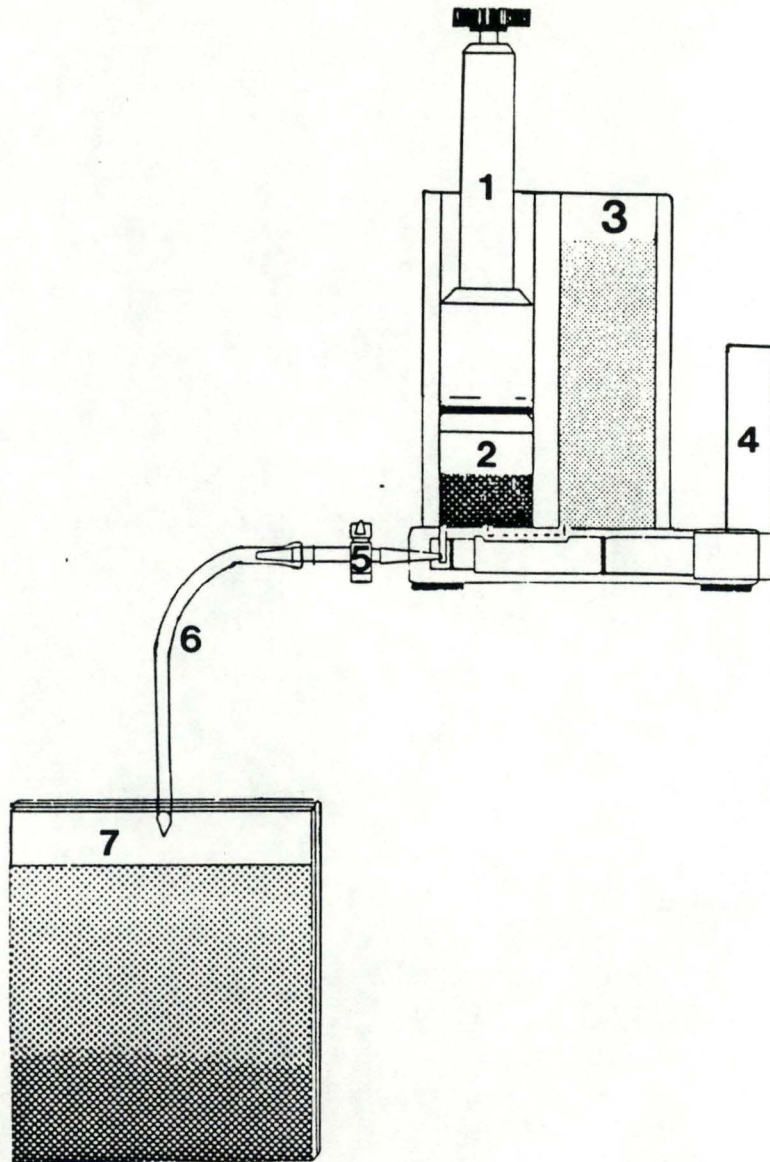
6.2.1. Le matériel

Nous utilisons un "gradient former" qui permet de couler des gels en gradient linéaire, concave ou convexe. Les principales qualités de ce matériel sont une utilisation aisée et une bonne reproductibilité des gels.

Il présente une chambre de mélange et une chambre réservoir de volume identique qui peuvent être mises en communication. Un "tubing" amène le polyacrylamide dans l'interstice entre les 2 plaques de verre limitées aux extrémités latérales par des intercalaires.

L'étanchéité du "sandwich" est le critère nécessaire pour réussir un gel.

..//..



"Gradient former"

- 1 Piston
- 2 Chambre de mélange contenant la solution d'acrylamide à 20%
- 3 Chambre réservoir contenant la solution d'acrylamide à 4%
- 4 Système permettant l'ouverture et la fermeture de la communication entre les 2 chambres
- 5 Robinet de sortie
- 6 Tuyau amenant l'acrylamide dans l'interstice entre les 2 plaques en verre
- 7 Plaques en verre

6.2.2. Le gel en gradient concave.

Dans certains cas, l'observation permet de déceler un grand nombre de protéines dans une zone du gel linéaire. Nous observons un grand nombre de bandes protéiques au sommet du gel, c'est pourquoi un gel en gradient exponentiel se justifie. Nous avons utilisé un gel en gradient concave, c'est-à-dire un gel dans lequel nous avons réduit les concentrations élevées en acrylamide dans la partie inférieure du gel et nous avons augmenté les concentrations faibles en acrylamide dans la partie supérieure du gel.

L'avantage de ce gel en gradient concave est une meilleure séparation des protéines de poids moléculaire élevé vis-à-vis des molécules de poids moléculaire faible et la résolution d'un plus grand nombre de fractions antigéniques.

Cette dernière propriété est aussi le résultat de l'utilisation d'un gel de hauteur accrue (16cm) qui permet une durée de migration plus grande.

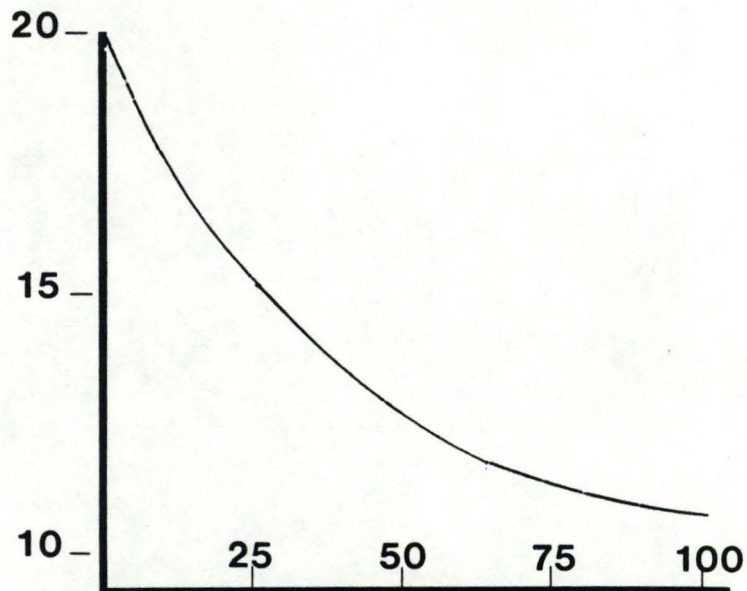
L'acrylamide est coulé par le sommet.

Le volume de la solution lourde dans la chambre de mélange (2) est le 1/4 du volume total du gel et le volume de la solution légère dans la chambre "réservoir" (3) est l'entièreté du volume du gel, c'est-à-dire 4/4.

Quand le "sandwich" est rempli, il reste 1/4 du volume du gel dans la chambre de mélange car son volume est fixé.

..../..

% en acrylamide

quantité d'acrylamide
délivrée (%)

Le gradient concave est décrit par l'équation :

$$C_t = C_R - (C_R - C_M) e^{-V_t/V_M}$$

C_t : concentration du gradient au temps t

C_R : concentration dans le réservoir

C_M : concentration initiale dans la chambre de mélange

V_t : volume délivré au temps t

V_M : volume d'acrylamide dans la chambre de mélange

6.3. Résolution de l'antigène par électrophorèse.

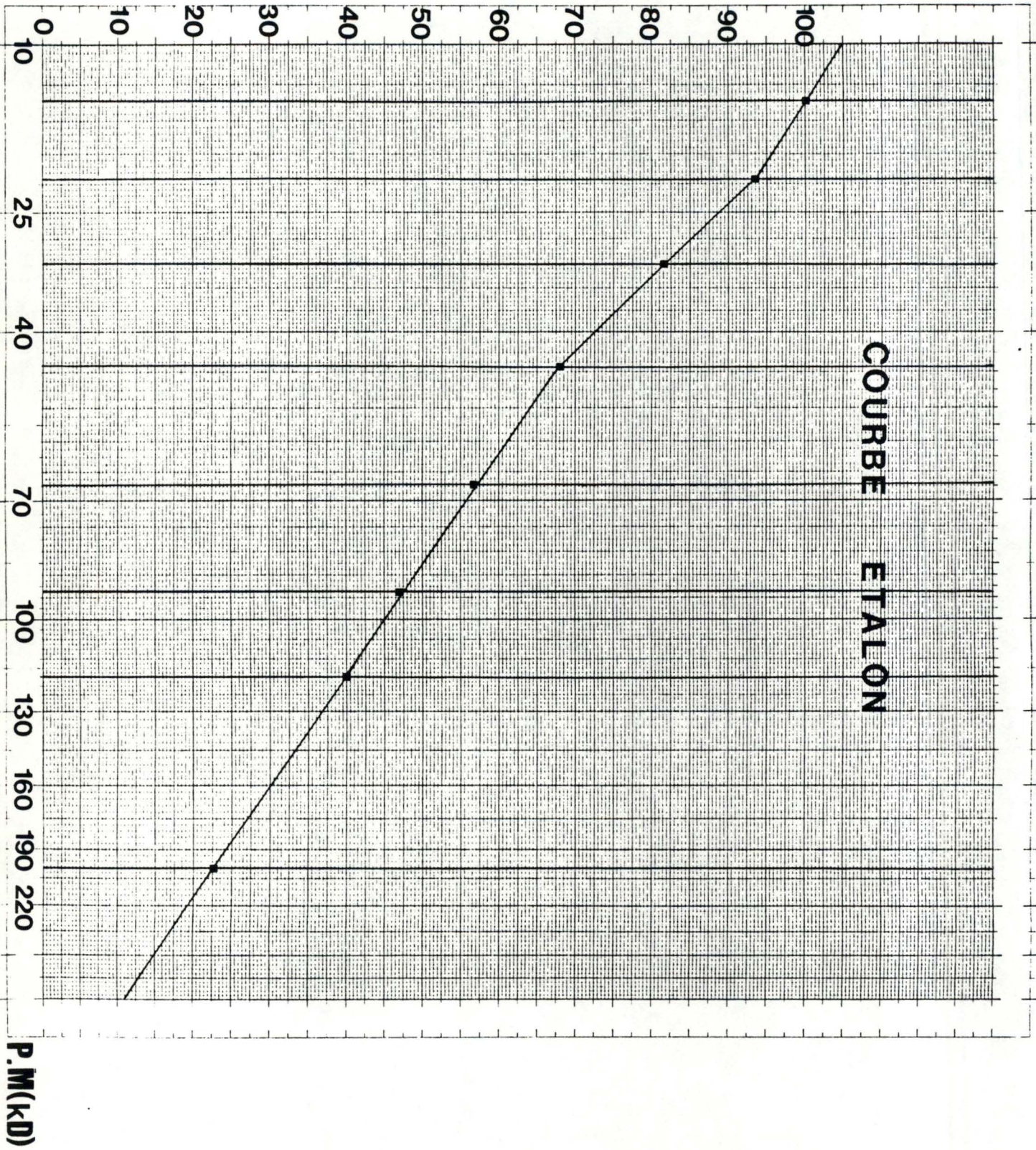
6.3.1. Les standards poids moléculaires (Bio-Rad)

Nous devons disposer de protéines de poids moléculaire déterminé afin d'identifier les différents antigènes toxoplasmiques. La détermination des poids moléculaires des fractions protéiques séparées par électrophorèse s'est faite graphiquement. En effet, en mettant sur papier semi-logarithmique la mobilité relative (%) en ordonnée et le poids moléculaire en abscisse, nous obtenons une "droite" qui est reproductible lors des différentes migrations des standards.

Pour déterminer le poids moléculaire d'une fraction protéique du toxoplasme, il suffit de mesurer la distance de migration, de calculer la mobilité relative et, en la reportant sur le graphe, il est aisé de lire le poids moléculaire.

La mobilité relative est calculée par rapport au front de migration du lysozyme (standard de PM le plus faible).

mobilité relative (%)





<u>PM</u> kD	<u>PROTEINES</u>	<u>MOBILITE RELATIVE</u>
200	myosine	22,8%
116,25	B galactosidase	39,8%
92,5	phosphorylase B	46,3%
66,2	sérum albumine bovine	56,6%
45	ovalbumine	68,3%
31	anhydrase carbonique	82,1%
21,5	inhibiteur de la trypsine	93,4%
14,4	lysozyme	100,0%

L : protéines de poids moléculaire faible

H : protéines de poids moléculaire élevé

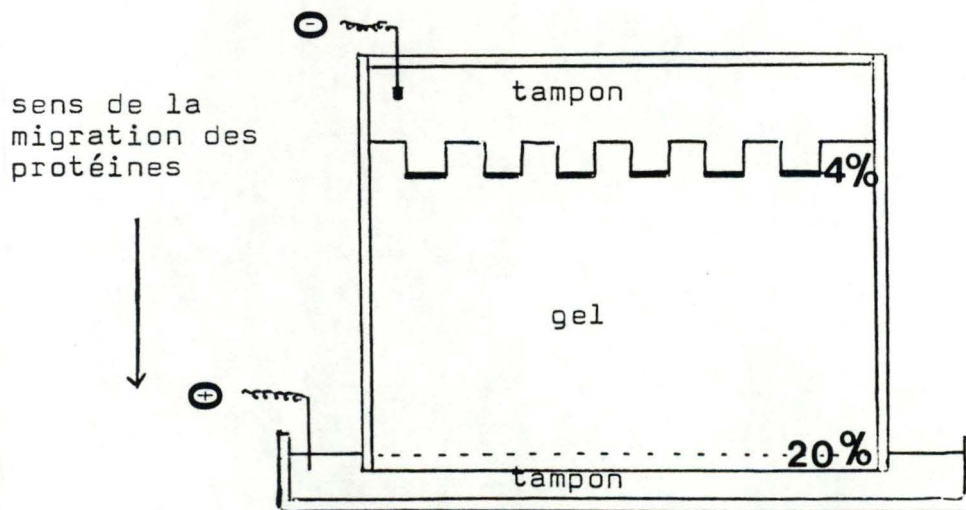
6.3.2. La migration.

Avant d'utiliser le gel, les alvéoles sont lavées trois fois avec du tampon TRIS pH 8,35 SDS 0,2%. Afin d'équilibrer le gel et d'empêcher le contact de l'antigène avec le persulfate d'ammonium, nous réalisons une pré-électrophorèse dans le tampon TRIS pH 8,35 SDS 0,2%. Après le dépôt de l'échantillon, nous réalisons une électrophorèse dans le même tampon.

La migration des protéines s'effectue de la cathode vers l'anode car elles présentent une charge totale négative de par la présence du SDS dans les tampons. En effet, le SDS est un détergent anionique qui substitue les charges électriques propres à la protéine par des charges négatives. Donc, la séparation des protéines va se faire en fonction de leur poids moléculaire.

Le profil électrophorétique montre des fractions protéiques de faible poids moléculaire dans la zone des concentrations élevées en acrylamide et des fractions protéiques de haut poids moléculaire dans la zone des concentrations faibles en acrylamide.

Les protéines peuvent être révélées par une coloration au bleu de Coomassie, à l'argent, ou mieux par une double coloration (argent, bleu de Coomassie).



VII. TRANSFERT SUR NITROCELLULOSE DES COMPOSANTES PROTEIQUES DE L'ANTIGENE.

7.1. Le blotting.

Le blotting est le transfert de protéines séparées par électrophorèse sur une membrane, de manière à conserver le schéma électrophorétique.

Nous avons utilisé un potentiel électrique comme force de transfert, car l'électroblotting est la forme la plus efficiente.

Le blotting est une alternative de l'immunoprécipitation, spécialement destiné à analyser des molécules dénaturées dans des gels SDS.

Le but du blotting est donc, de corréliser une fonction biologique avec la présence d'une protéine spécifique. Cet objectif est réalisé en examinant la membrane après réaction d'un conjugué.

7.2. La membrane de nitrocellulose.

La nitrocellulose est utilisée pour l'électroblotting des protéines car :

- elle est facile à manipuler et ne requiert pas d'activation.
- elle peut être colorée à l'amidoschwarz pour détecter les protéines. (Ce colorant est préféré au bleu de Coomassie qui colore uniformément la nitrocellulose.)
- l'immunoessai peut être réalisé pour détecter les antigènes.
- la détection est très sensible.
- les sites non spécifiques sont facilement et rapidement bloqués pour empêcher des problèmes de "background".

Le principal désavantage de la nitrocellulose est son inutilisation pour l'électroblotting des acides nucléiques.

Au pH 8,3, la nitrocellulose est chargée négativement comme les protéines qui y sont absorbées. Au-delà de ce pH, les protéines, dont le point isoélectrique est supérieur, ne seront pas transférables.

7.3. Les avantages du blotting.

7.3.1. L'accessibilité.

Les protéines sont inaccessibles quand elles sont distribuées à travers la matrice du gel.

Le transfert à la surface d'une membrane permet de les analyser dans un temps réduit et avec de faibles quantités de réactifs.

7.3.2. Liaison des protéines à la membrane.

Après l'électrophorèse, les molécules sont libres de diffuser dans le gel. Une fixation de celles-ci détruit l'activité biologique. Donc, pour détecter directement l'activité biologique dans les gels, une diffusion et une perte de résolution doivent être tolérées.

Les molécules transférées sont liées à la membrane, ce qui empêche la perte de résolution et la diffusion, et permet le stockage de la membrane avant la réaction avec l'anticorps.

7.3.3. La fiabilité.

Les transferts sont exacts et reproductibles dans des conditions optimales, car le potentiel électrique peut être contrôlé et quantifié.

VIII. LA REVELATION DES FRACTIONS IMMUNOGENES.

8.1. Les colorations.

Après l'électrophorèse qui sépare les protéines selon leur poids moléculaire, le gel est toujours uniformément transparent. La visualisation des bandes protéiques est rendue possible grâce à une coloration au bleu de Coomassie ou par une coloration à l'argent.

- Le bleu de Coomassie est un colorant qui teinte en bleu toutes les protéines.
- La coloration à l'argent est préférée car elle est 10 à 50 fois plus sensible que le bleu de Coomassie; les protéines apparaissent colorées en jaune.

Une nouvelle technique allie les 2 colorations, c'est-à-dire qu'après une coloration à l'argent, le gel est coloré au bleu de Coomassie. Cette double coloration différencie les protéines. En effet, les antigènes de nature polypeptidique sont colorés en bleu et les antigènes de natures glycoprotéique et lipidique sont colorés en jaune.

La mise en évidence des bandes protéiques dans la nitrocellulose ne peut se faire que par une coloration à l'amidoschwarz.

8.2. Les méthodes immunologiques.

Les substances intéressantes pour les analyses en biologie clinique sont présentes en très petites quantités dans les liquides biologiques; c'est pourquoi, une technique d'immunoessai est utilisée pour leur détection.

8.2.1. Radio-immunoessai (RIA).

La mesure du taux d'antigène s'obtient par addition d'une quantité connue d'antigène radio-marqué suivie de la détermination de la quantité d'antigène combinée à l'anticorps. Etant donné que l'antigène est en excès, les complexes Ag-Ac seront solubles. Aussi faut-il les précipiter pour séparer l'antigène radioactif lié dans ces complexes de l'antigène radioactif libre.

La mesure de la radioactivité dans le surnageant permet de déterminer l'importance de la fraction antigénique fixée et par conséquent, la quantité d'anticorps qui se trouvait dans l'antisérum.

Cette technique est très sensible si elle utilise un élément radioactif énergétique. Elle est utilisée par les quelques laboratoires qui présentent des mesures de sécurité et un équipement adéquat.

8.2.2. Enzyme-immunoessai (EIA).

Cette technique est utilisée pour sa grande sensibilité. D'autres avantages non négligeables lui donnent la priorité sur d'autres techniques :

- Elle est spécifique.
- Les dangers de la radioactivité sont éliminés.
- Elle est rapide et simple.
- La visualisation peut se faire sans matériel.

Toutefois, pour obtenir un résultat valable, de nombreux tests sont requis. Ces tests portent principalement sur les dilutions des sérums et des conjugués, et sur les solutions de dilution.

8.2.3. Utilisation de l'enzyme-immunoessai.

Après séparation des antigènes toxoplasmiques par électrophorèse sur gel de polyacrylamide, l'électroblotting des antigènes sur la nitrocellulose est réalisé.

Les sites non antigéniques de la nitrocellulose sont bloqués avec une protéine non réactive : l'albumine bovine (BSA).

La membrane de nitrocellulose sur laquelle sont liés les antigènes toxoplasmiques est incubée avec le sérum contenant les anticorps toxoplasmiques. Après lavage, elle est incubée avec un second anticorps couplé à la peroxydase. Sa mise en présence avec le substrat révèle l'activité de cet enzyme via une substance chromogène.

8.2.3.1. Préliminaires.

Après l'électroblotting des antigènes, la nitrocellulose est saturée avec de l'albumine bovine à 5%. Cette protéine non réactive se fixe sur les sites non antigéniques et va empêcher la formation de liaisons non spécifiques lors de la mise en contact de la nitrocellulose avec le sérum du malade.

Après rinçage au TBS (tampon TRIS NaCl), la nitrocellulose peut être utilisée pour l'enzyme-immunoessai.

8.2.3.2. Addition du sérum.

La nitrocellulose est incubée avec le sérum humain contenant les différentes Ig toxoplasmiques. Les anticorps vont reconnaître spécifiquement les antigènes toxoplasmiques et vont former des complexes Ag.Ac. Ensuite, la nitrocellulose est lavée pour éliminer les anticorps qui n'ont pas réagi avec les antigènes.

8.2.3.3. Addition du conjugué.

La nitrocellulose est incubée avec un conjugué dirigé contre la classe d'Ig recherchée. Ce conjugué est un second anticorps couplé à une enzyme : la peroxydase (PM : 190.000) qui est utilisée pour sa stabilité. Il est obtenu en récupérant les Ig présentes dans le sang d'une chèvre immunisée avec des Ig humaines.

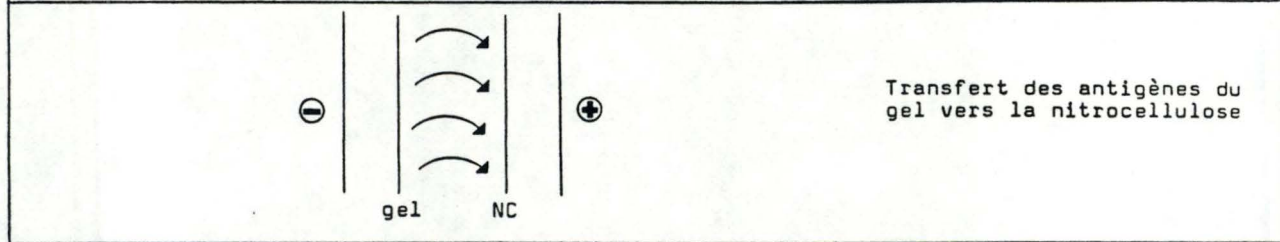
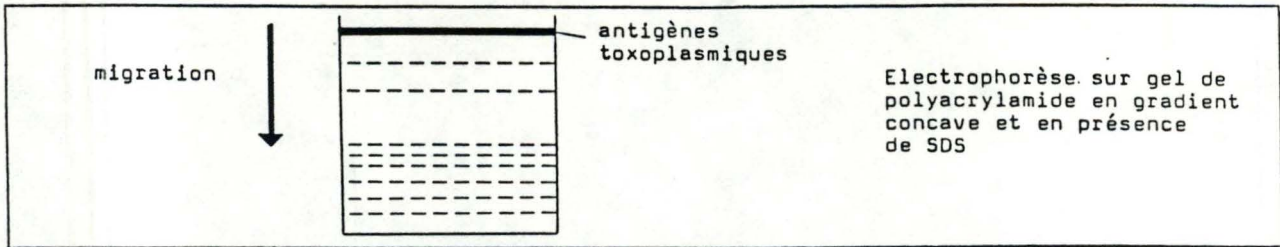
Après purification des anticorps spécifiques par chromatographie d'affinité, les Ig sont couplées à la peroxydase. Cette liaison est réalisée en 2 étapes successives : d'abord, une oxydation par le periodate de sodium et ensuite une réduction par le borohydrure de sodium (technique de Wilson et Nakane (1978)).

Après des lavages qui éliminent le conjugué qui n'a pas réagi, nous révélons le complexe immunologique.

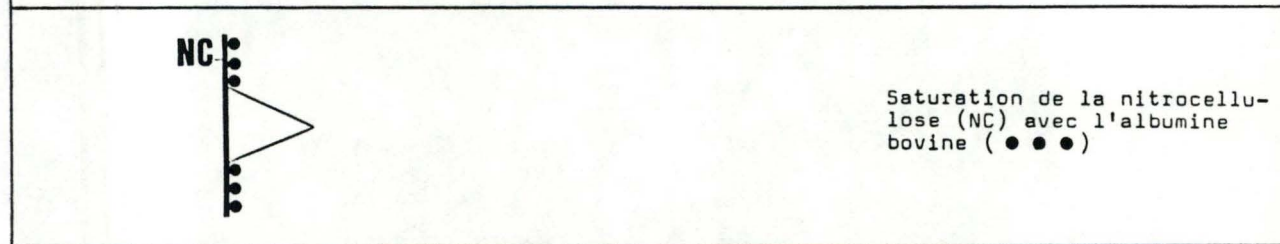
8.2.3.4. La révélation.

La révélation est possible grâce à l'activité de l'enzyme. Ainsi, nous ajoutons le substrat (H_2O_2) sur lequel agit l'enzyme qui, couplée à une substance chromogène (4 chloro-1-naphtol), voit modifiées ses propriétés chimiques et physiques. En effet, au départ, ce chromogène est soluble et incolore et après réaction avec le substrat, il devient insoluble et coloré en mauve.

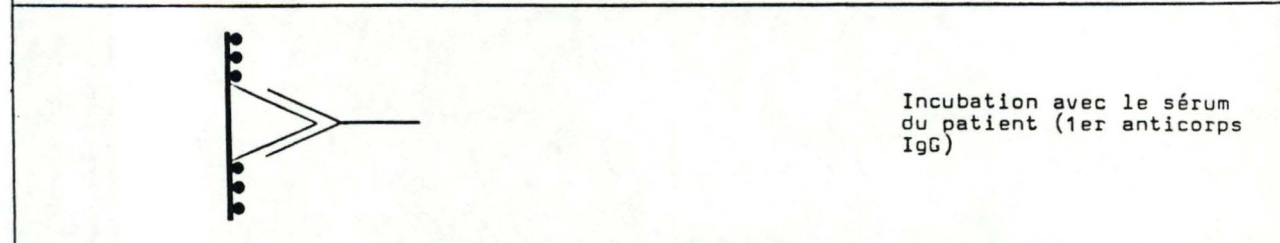
Il doit être spécifique de la peroxydase, donner un dérivé coloré après réaction et ne doit pas inhiber ou dénaturer l'enzyme. La préférence donnée au chloro-1-naphtol par rapport au diaminobenzidine (DAB) ou à l'orthophénylène-diamine (OPD) est justifiée par la formation d'un précipité coloré insoluble au contraire des autres substances qui sont solubles après réaction. Toutefois, le 4 chloro-1-naphtol est nocif et cancérigène.



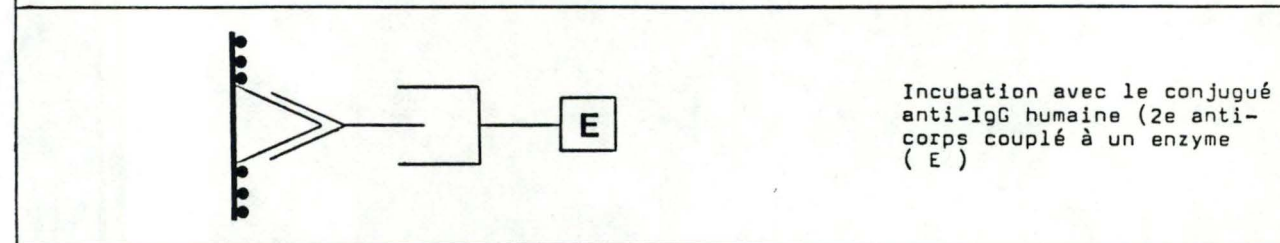
LAVAGES



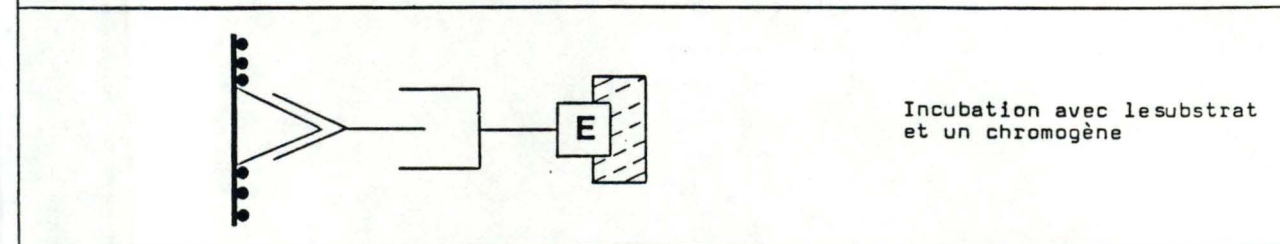
LAVAGES



LAVAGES







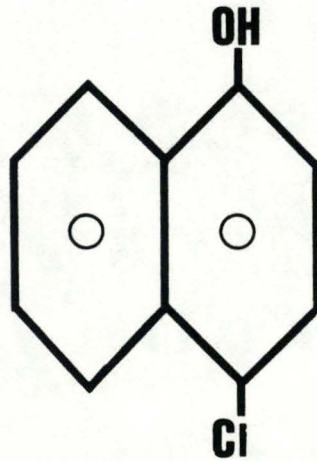
LAVAGES



LE WESTERN BLOT

LEGENDE

-  antigène
-  1er anticorps (IgG)
-  anti-IgG humaine couplé à la peroxydase (E)
-  coloration



4 chloro - 1 - naphtol

Une protéine possède plusieurs déterminants antigéniques qui peuvent fixer des Ig de classes différentes.

Donc, le schéma du western blot est valable pour les différentes classes d'Ig (IgM, IgA, IgE, IgG).

L'utilisation du conjugué correspondant (anti-IgM, anti-IgA, anti-IgE, anti-IgG) marque la spécificité de la réaction.

8.3. Conclusions

Nous avons utilisé une méthode immunologique indirecte pour détecter les fractions protéiques car :

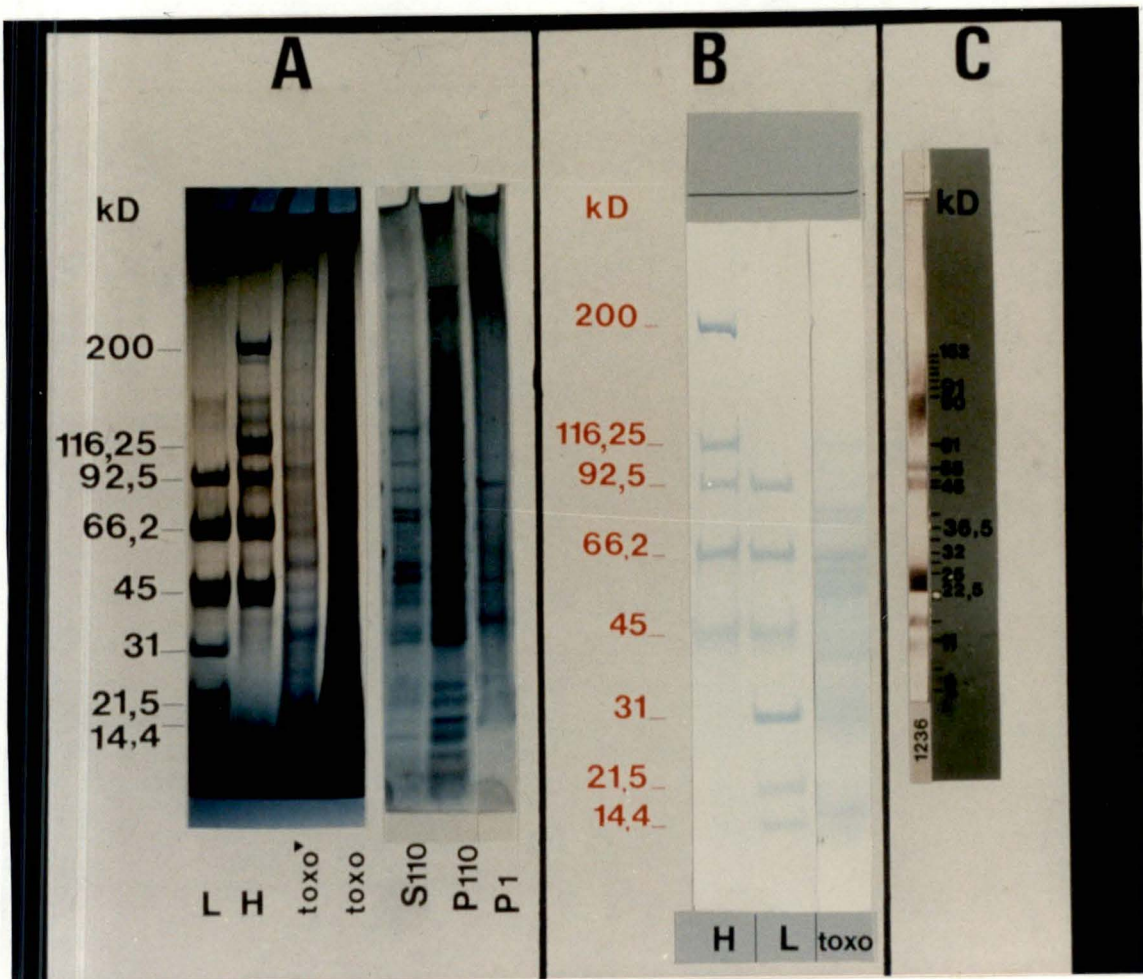
- elle est plus spécifique que la méthode directe dans laquelle la peroxydase est liée au premier anticorps. La spécificité du conjugué permet l'identification de la classe de l'Ig spécifique du parasite.
- elle est plus souple par la substitution de l'antisérum primaire contre une large variété d'antigènes.
- elle peut être soumise à des contrôles spécifiques en remplaçant le premier antisérum par des autres de la même origine mais de spécificité déplacée.
- la réaction est plus marquante que dans la méthode directe car plusieurs molécules d'antiglobuline marquée se fixent sur chaque molécule d'anticorps réagissant avec un antigène.

Nous nous sommes limités à une analyse qualitative de la réaction Ag-Ac mais il est possible d'analyser quantitativement la réaction.

IX. RESULTATS EXPERIMENTAUX.

9.1. La mosaïque antigénique du toxoplasme.

P.M. des antigènes (kD)	caractéristiques			antigènes confirmés dans la biblio.(5,18, 19,21,22,23,24,29,31, 32,39,46)	
				PM (kD)	
5,5	insoluble			6	
7,5	insoluble				
11	soluble				
12	insoluble				
15	insoluble	membranaire	polypeptide	14	Mb
20	insoluble		polypeptide	20	
22,5	insoluble	membranaire	polypeptide	22	
25	soluble			25	
28	insoluble	membranaire		27	Mb
29	insoluble			30	
32	soluble		polypeptide	32	
35	insoluble	membranaire	polypeptide	35	Mb
36,5	soluble				
39,5	soluble			40	
43	insoluble	membranaire		43	Mb
45	soluble			45	
50	soluble			50	
55	soluble				
58	insoluble				
61	insoluble	membranaire	polypeptide	62	
67	soluble			66	
73	insoluble				
83,5	soluble				
91	insoluble				
103	insoluble				
118	soluble				
125,5	soluble				
137	soluble				
152	soluble				
180	soluble				
208	insoluble				



Possibilités de détection des protéines

- (A). Protéines antigéniques révélées dans le gel de polyacrylamide par une double coloration.

L : Protéines de faible PM.

H : Protéines de PM élevé.

toxov : Ag membranaires, cytoplasmiques et métaboliques du toxoplasme traités au dithiothréitol.

toxov : Ag membranaires, cytoplasmiques et métaboliques.

S 110 : Antigènes solubles.

P 110 : Antigènes insolubles et solubles.

P 1 : Antigènes insolubles (membranaires).

- (B). Protéines antigéniques révélées sur la nitrocellulose par une coloration à l'amidoschwarz.

- (C). Protéines antigéniques révélées sur la nitrocellulose par une réaction immunoenzymatique.

Recherche d'IgG(F(ab)₂) dans le sérum 1236 par blotting.

9.2. Les IgM



Recherche des IgM par blotting

9.2.1. Sérums négatifs en anticorps toxoplasmiques.

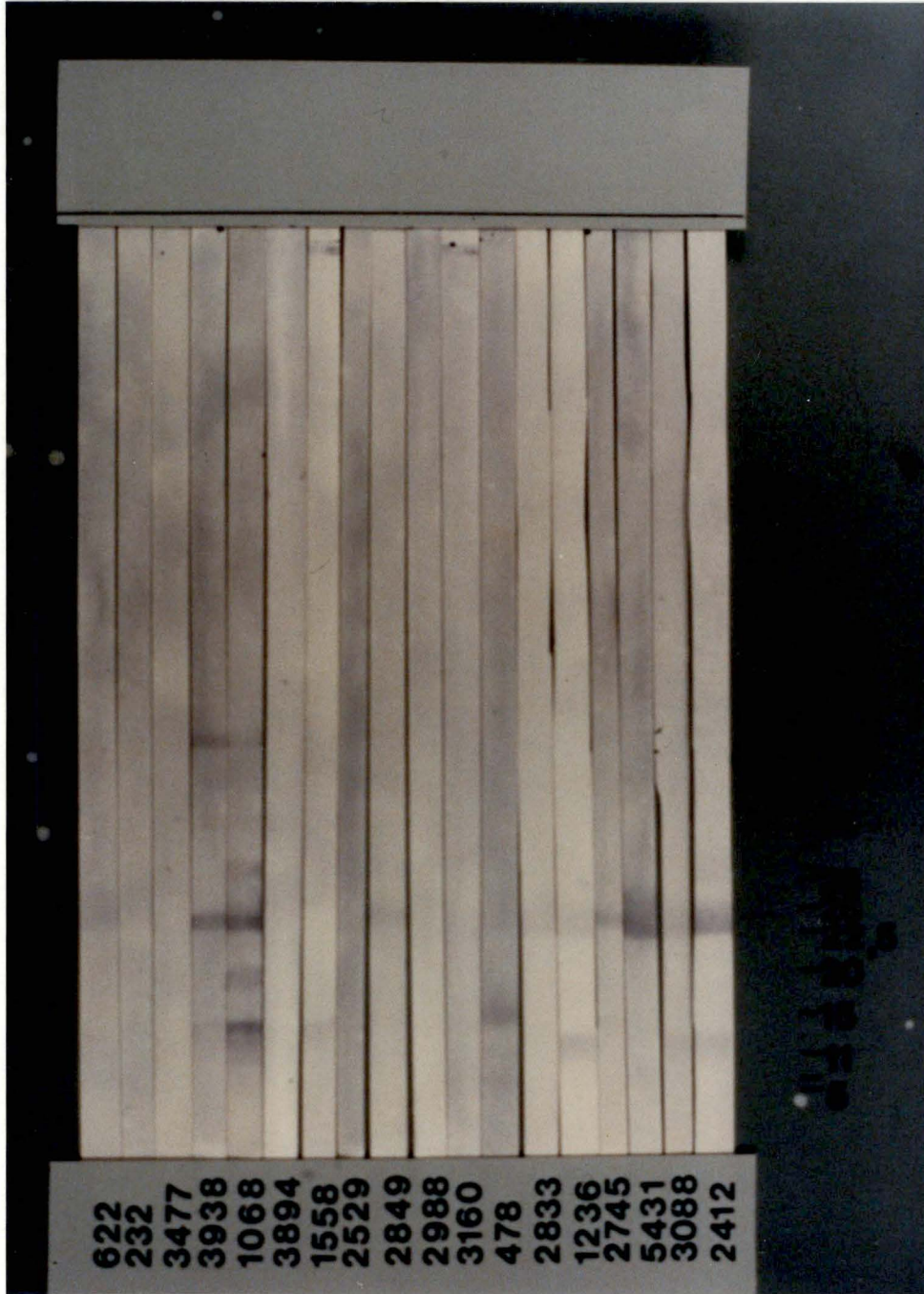
Un antigène de PM = 67 kD est présent dans les sérums 622 et 232.

Fréquence = 50,0%

9.2.2. Sérums positifs en anticorps toxoplasmiques.

PM des fractions reconnues (kD)		Sérums positifs pour la fraction	Fréquence (%)
5 → 11	I	3938-1068-3894-1558-2529 2849-478-1236-2745-3088- 2412	68,7
15	I Mb PP	3938-1068-2529-2849- 478-1236	31,2
22,5	I Mb PP	3938-1068-2849-1236- 2745-3088-2412	50
25	S	1558-478	12,5
32	S PP	1236	6,2
39,5	S	982-1236-2412	18,7
45	S	3938-1068-1236-2412	25
50	S	3938-1068-1236-2412	25
58	I	1236-2412	12,5
61	I Mb PP	982-478-1236-2412	25
67	S	982	6,2
73	I	478	6,2
83,5	S	3938-478-1236	18,7

9.3. Les IgA.



Recherche des IgA par blotting

9.3.1. Sérums négatifs en anticorps toxoplasmiques.

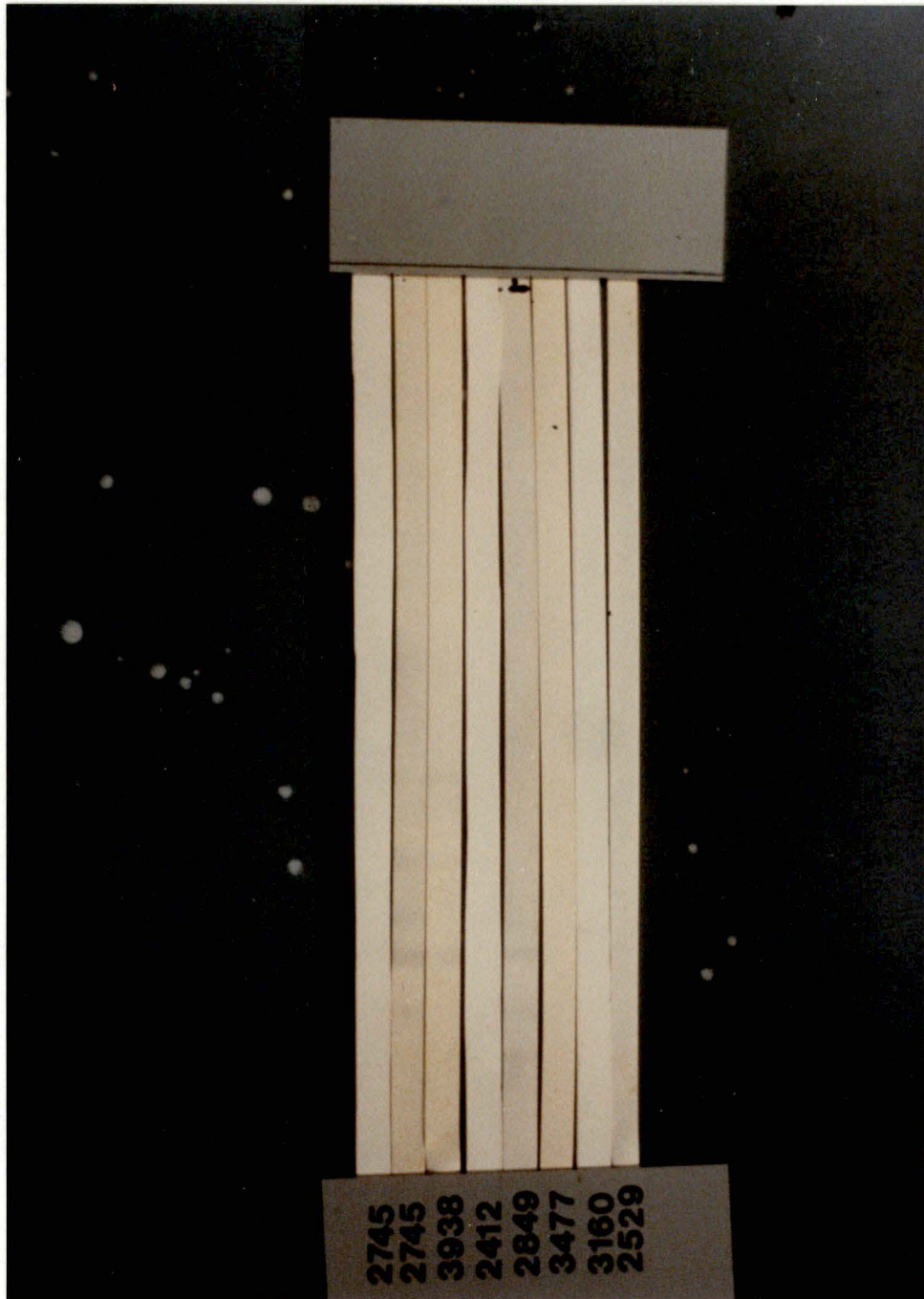
Un antigène de PM = 67 kD est présent dans les sérums 622-232 et 2988.

Fréquence = 75%

9.3.2. Sérums positifs en anticorps toxoplasmiques.

PM des fractions reconnues (kD)		Sérums positifs pour la fraction	Fréquence (%)
5 → 11	I	3938-1068-1558-478-1236- 2745-5431-3088-2412	60
15	I Mb PP	3938-1068-1558-478-2745	33,3
20	I PP	1068	6,7
22,5	I Mb PP	3938-1068-2849-478-2833- 1236-2745-5431-3088-2412	66,7
25	S	3938-1068-2849-478-2833- 1236-2745-5431-3088-2412	66,7
28	I Mb	3894-2745-2412	20
29	I	1068-2412	13,3
32	S PP	2529-478-5431	20
35	I Mb PP	3938-1068-2529-5431	26,7
43	I Mb	3938-1068-2529-5431	26,7
50	S	3938-1068-2529	20
67	S	478	6,7

9.4. Les IgE

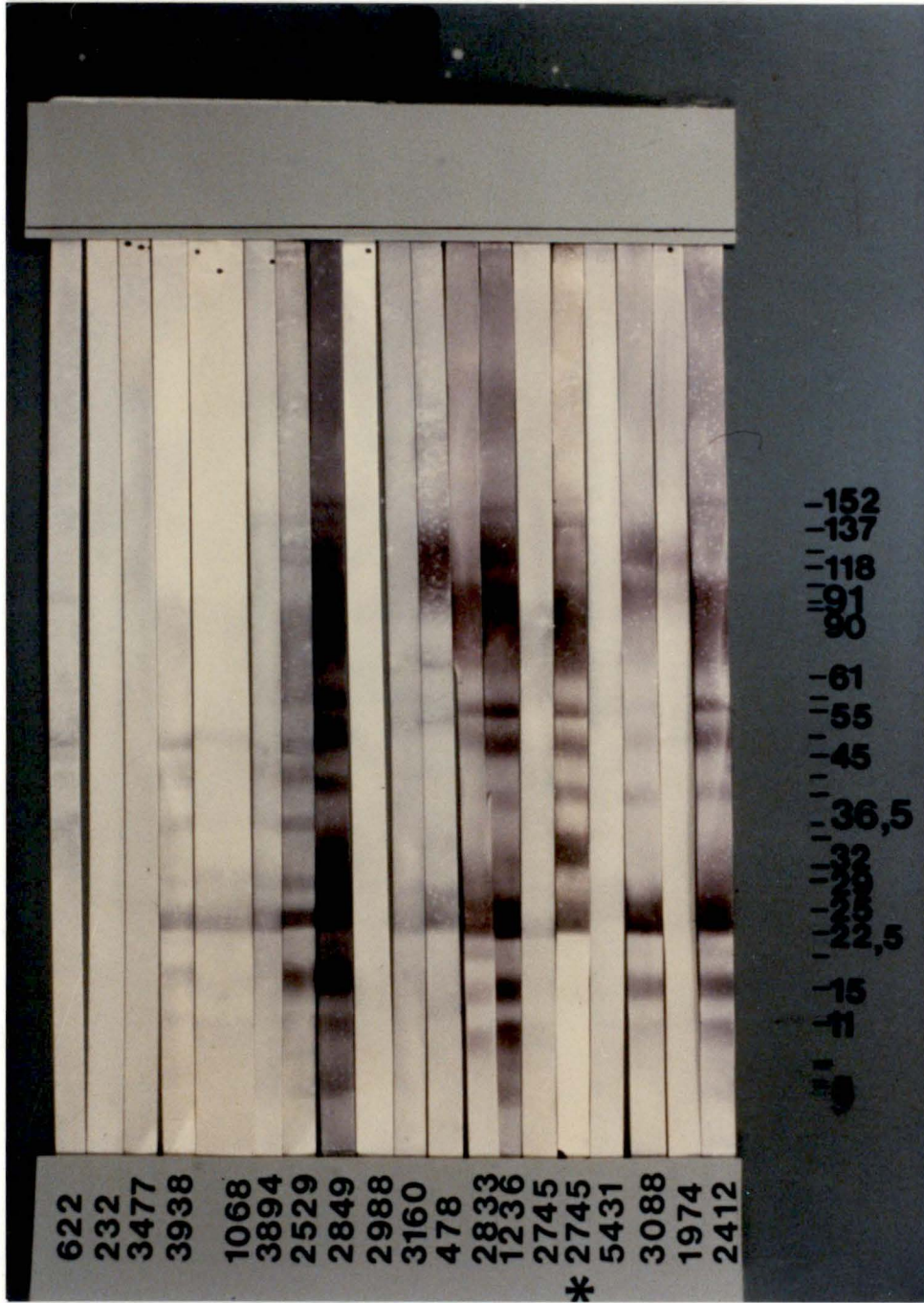


Recherche des IgE par blotting

9.4.1. Sérums positifs en anticorps toxoplasmiques.

PM des fractions reconnues (kD)	Sérums positifs pour la fraction	Fréquence (%)
5 11 I	2849	16,7
15 I Mb PP	2745-2849	33,3
22,5 I Mb PP	2745-3938-2849	50
28 I Mb PP	2745	16,7
35 I Mb PP	2745-3938	33,3

9.5. Les IgG.



Recherche des IgG par blotting

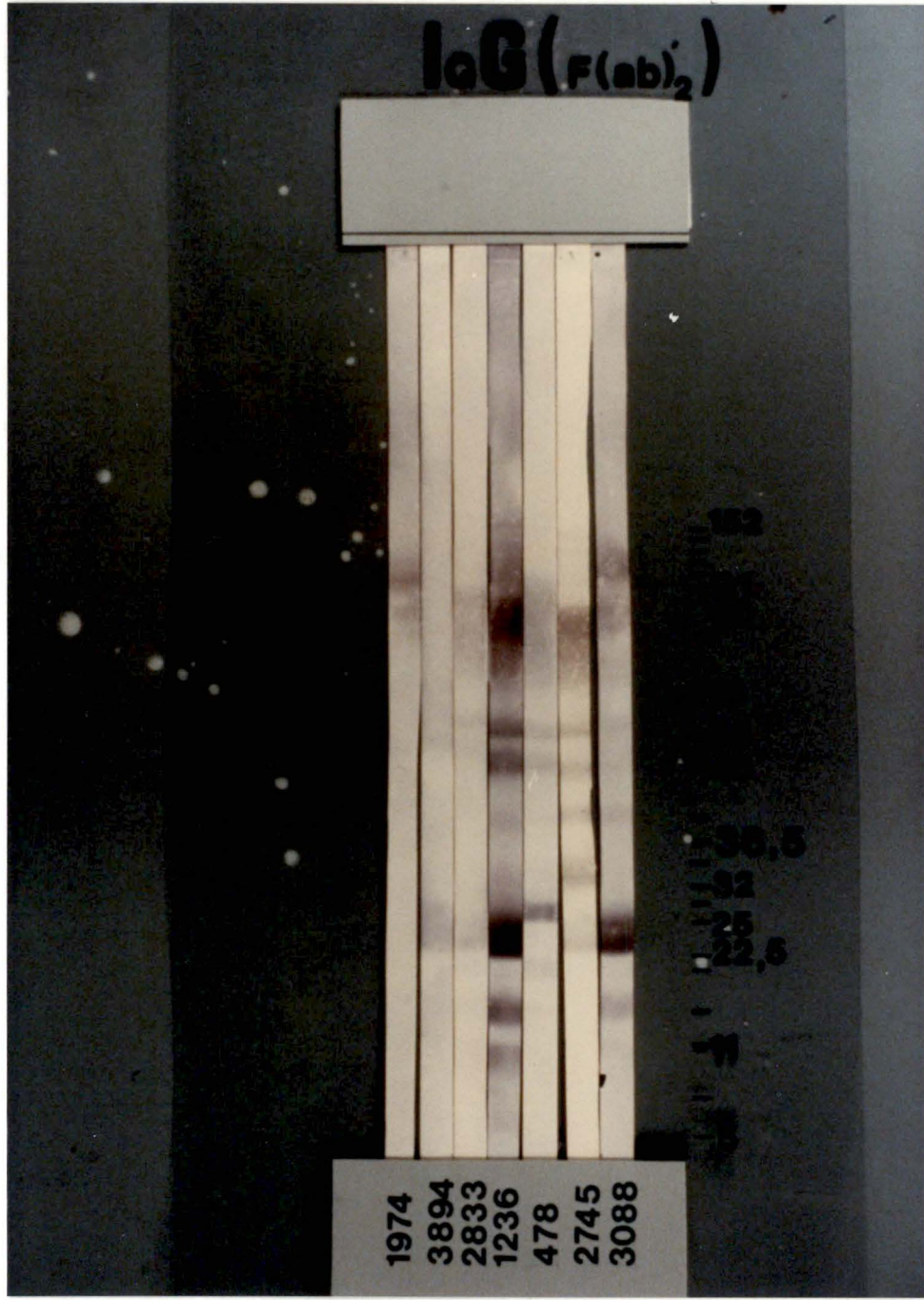
9.5.1. Sérums négatifs en anticorps toxoplasmiques.

PM des fractions reconnues (kD)		Sérums positifs pour la fraction	Fréquence (%)
36,5	S	622	20
91	I	622-1974	40

9.5.2. Sérums positifs en anticorps toxoplasmiques.

PM des fractions reconnues (kD)		Sérums positifs pour la fraction	Fréquence (%)
5 → 11	I	3938-1068-3894-2529-2849- 2833-1236-2745-3088-2412	71,4
15	I Mb PP	3938-1068-3894-2529-2849- 2833-1236-2745-3088-2412	71,4
20	I PP	3938-2849-2833-1236-2412	35,7
22,5	I Mb PP	3938-1068-3894-2529-2849- 3160-478-2833-1236-2745- 5431-3088-2412	92,9
25	S	3938-1068-3894-2529-2849- 3160-478-2833-1236-2745- 5431-3088-2412	92,9
29	I	3938-1068-3894-2529-2833	35,7
32	S PP	2833-1236-2745	21,4
35	I Mb PP	2849-2745	14,3
36,5	S	3938-1068-3894-2529	28,6
39,5	S	1236-2745-3088-2412	28,6
43	I Mb	3938-2529-2849	21,4
45	S	3938-1068-2529-2849-478- 2833-1236-2745-3088-2412	71,4
50	S	3938-1068-2529-2849-478- 2833-1236-2745-3088-2412	71,4
55	S	3938-1068-2529-2849-478- 2833-1236-2745-3088-2412	71,4
58	I	2849-478	14,3
61 → 90	Mb PP	2529-2849-478-2833-1236- 2745-3088-2412	57,1
91	I	2849-478-2833-1236-2745- 3088-2412	50
103	I	2529-478-1236-2745-3088	35,7
118	S	2529-2849-478-1236-2745- 3088-2412	50
125,5	S	3894-2529-2849-478-2833- 1236-5431-3088-2412	64,3
137	S	1236-3088	14,3
152	S	2849-1236-2745-2412	21,4

9.6. Les IgG (F(ab)₂)



Recherche des IgG(F(ab)₂) par blotting

9.6.1. Sérums négatifs en anticorps toxoplasmiques.

PM des fractions reconnues (kD)	Sérums positifs pour la fraction	Fréquence (%)
36,5 S	1974	100
91 I	1974	100

9.6.2. Sérums positifs en anticorps toxoplasmiques.

PM des fractions reconnues (kD)	Sérums positifs pour la fraction	Fréquence (%)
5→11	1236	16,7
15 I Mb PP	3894-2833-1236-478-3088	83,3
20 I PP	2833-1236-478	50
22,5 I Mb PP	3894-2833-1236-2745-3088	83,3
25 S	3894-2833-1236-478- 2745-3088	100
29 I	3894-478	33,3
32 S PP	3894-1236-2745	33,3
35 I Mb PP	3894-2745	33,3
39,5 S	1236-2745-3088	50
45 S	1236-478-2745-3088	
50 S	1236-478-2745-3088	
55 S	1236-478-2745-3088	66,7
61→90 Mb PP	2833-1236-478-2745-3088	83,3
91 I	2833-1236-478-3088	66,7
103 I	2833-1236-478-3088	66,7
118 S	1236-3088	33,3
125,5 S	1236-2745-3088	50
137 S	1236-2745-3088	50
152 S	1236	16,7

9.7. Tableau récapitulatif.

PM des fractions du toxoplasme (kD)		Fréquence en IgM (%)	Fréquence en IgA (%)	Fréquence en IgE (%)	Fréquence en IgG (%)	G (%) F(ab) ₂	Total %
5 → 11	I	68,7	60	16,7	71,4	16,7	56,1
12	I	-	-	-	-	-	0
15	I	31,2	33,3	33,3	71,4	83,3	49,1
20	I	-	6,7	-	35,7	50	15,8
22,5	I	50	66,7	50	92,9	83,3	68,4
25	S	12,5	66,7	-	92,9	100	54,4
28	I	-	20	16,7	-	-	5,3
29	I	-	13,3	-	35,7	33,3	15,8
32	S	6,2	20	-	21,4	33,3	15,8
35	I	-	26,7	33,3	14,3	33,3	17,5
36,5	S	-	-	-	28,6	-	7
39,5	S	18,7	-	-	28,6	50	17,5
43	I	-	26,7	-	21,4	-	12,3
45	S	25	-	-	71,4	66,7	31,6
50	S	25	20	-	71,4	66,7	36,8
55	S	-	-	-	71,4	66,7	24,6
58	I	12,5	-	-	14,3	-	7
61	I	25	-	-	-	-	-
67	S	6,2	13,3	-	57,1	83,3	65
73	I	6,2	-	-			
83,5	S	18,7	-	-			
91	I	-	-	-	50	66,7	19,3
103	I	-	-	-	35,7	66,7	15,8
118	S	-	-	-	50	33,3	15,8
125,5	S	-	-	-	64,3	50	21
137	S	-	-	-	14,3	50	8,8
152	S	-	-	-	21,4	16,7	7
180	S	-	-	-	-	-	0
208	I	-	-	-	-	-	0

9.8. Titres en IgG et IgM des sérums et positivité en blotting

SERUMS	IF M	IF G	HA	HA ₂ ME	IgM	IgA	IgE	IgG	IgG F(ab) ₂
232	VN	VN	VN	X	Ac nat.	Ac nat.	X	-	X
478	VN	100 ⁺	512	X	+	+	X	+	+
622	VN	VN	VN	X	Ac nat.	Ac nat.	X	Ac nat.	X
982	+	100	128	X	+	X	X	X	X
1068	640	400	4096	64	+	+	X	+	X
1236	VN	1600	512	X	+	+	X	+	+
1558	320	6400	1024	X	+	+	X	X	X
1974	VN	VN	VN	X	X	X	X	Ac nat.	Ac nat.
2412	VN	400	4096	X	+	+	-	+	X
2529	VN	6400	16000	X	+	+	-	+	X
2745	VN	6400	8192	X	+	+	+	+	+
2833	VN	100	512	X	-	+	X	+	+
2849	VN	800	4096	X	+	+	+	+	X
2988	VN	VN	VN	X	-	-	X	-	X
3088	VN	100	512	X	+	+	X	+	+
3160	?	1600	1024	X	-	-	-	+	X
3477	VN	VN	VN	X	-	-	-	-	X
3894	40	1600	4096	4096	+	-	X	+	+
3938	160	1600	2048	1024	+	+	+	+	X
5431	VN	100 ⁺	512	X	-	+	X	+	X

Ac nat. : anticorps naturels

X : tests non réalisés

.../...

- sérum 2412 : sérum d'une femme possédant constamment un titre élevé en IgG depuis des années. Régulièrement, elle présente des accès de très grande fatigue. Cette personne développe probablement une toxoplasmose chronique.
- sérum 2745 : sérum prélevé chez une femme enceinte atteinte de toxoplasmose. Une semaine auparavant, un test d' IF révélait un titre positif en IgM. Un traitement à la Spiramycine a été instauré entre les deux prises de sang.
- sérum 2849 : sérum prélevé chez un patient 1 an après avoir contracté la toxoplasmose.
- sérum 3088 : ce sérum ne présente pas de particularités en anticorps toxoplasmiques mais est caractérisé par un titre très élevé dans la réaction de Waaler-Rose (recherche du facteur rhumatoïde IgM anti-IgG).

Les autres sérums sont des cas pathologiques dont les titres en IgG et IgM sont connus grâce aux techniques d'immunofluorescence et d'hémagglutination.

X. INTERPRETATIONS DES RESULTATS.

10.1. Les antigènes.

Le profil électrophorétique montre que la mosaïque du toxoplasme est composée de fractions de PM faible et moyen, les PM élevés étant peu représentés. Une hypothèse pourrait être avancée qui admettrait la destruction de certaines parties glycosylées des protéines ou un clivage des protéines de PM élevé par sécrétion d'enzymes hydrolytiques. Ceci explique que l'électrophorèse ne séparerait qu'une majorité de protéines de PM faible et moyen.

Ces antigènes peuvent être solubles ou insolubles. Parmi ces derniers, nous trouvons les protéines membranaires (P1) qui sont peu nombreuses (31,46,21). Une coloration différentielle (p.54) permet de se faire une idée quant à la nature de l'antigène. Nous observons 6 protéines de nature polypeptidique dont 5 sont insolubles. Ces polypeptides seraient d'origine membranaire. La 6e est soluble, quant aux autres protéines, elles sont de nature glycoprotéique.

Un traitement des toxoplasmes au dithiothréitol clive certaines protéines par rupture des ponts disulfures, ce qui se traduit par l'apparition et la disparition de certaines fractions par rapport à un schéma électrophorétique de toxoplasmes non traités. (ex: les fractions de PM=5 à 11 kD ont disparu). De plus, l'action conjuguée de la chaleur et du dithiothréitol modifie la configuration protéique et les épitopes ne sont plus reconnus par les anticorps. Les tests immunoenzymatiques ne donnent plus de résultats.

Grâce à une plus grande sensibilité (± 1 ng), la coloration à l'argent montre 3 fractions distinctes de PM = 5 à 11 kD, alors que ces fractions de faible PM ne sont pas révélées par les colorations au bleu de Coomassie ou à l'amidoschwarz (32).

10.2. Les anticorps.

L'étude des anticorps toxoplasmiques par le blotting nous a révélé la présence de 2 types d'anticorps. D'une part, nous avons trouvé des anticorps "naturels" et d'autre part, des anticorps spécifiques du toxoplasme.

En effet, les sérums ne possédant pas d'anticorps spécifiques du toxoplasme, présentent des Ig dirigées contre des antigènes ubiquitaires (\square). L'immunisation s'est faite en dehors de tout contact avec le protozoaire.

Ces antigènes sont des constituants du monde vivant qui existent aussi chez le toxoplasme. Certains sérums positifs en anticorps toxoplasmiques présentent des Ig dirigées contre ces antigènes ubiquitaires. Outre ces anticorps naturels, d'autres Ig spécifiques sont dirigées contre les nombreux antigènes spécifiques du toxoplasme.

De plus, une protéine possède plusieurs épitopes qui peuvent fixer des Ig de classes différentes. Donc, ces différentes Ig sont dirigées contre une fraction antigénique commune (32).

Le profil électrophorétique montre 3 antigènes de PM = 12,180 et 208 kD qui ne sont reconnus par aucune Ig. ces antigènes pourraient être des protéines auxquelles les lymphocytes n'auraient pas accès car elles seraient enfouies. Toutefois, ces 3 antigènes sont décelés par une électrophorèse sur gel de polyacrylamide en gradient concave, du fait qu'un maximum de protéines sont libérées lors du passage des trophozoïtes aux ultrasons.

L'utilisation d'un détergent (Tween 20) incorporé dans la solution d'albumine bovine servant à diluer les sérums et les conjugués, diminue la coloration de fond et augmente l'intensité des fractions. Mais, il supprime les fractions de faible PM (ex : recherche des IgG dans le sérum 2745^{*}). Nous avons préféré ne pas l'utiliser (53).

10.3. Les IgM.

Les IgM réagissent principalement avec les antigènes de faible PM et le plus fréquemment avec des antigènes insolubles. Les fractions de PM = 5 → 11 kD, 15 kD et 22,5 kD seraient des protéines de surface qui sont reconnues au début de la maladie. Elles ont un grand pouvoir d'antigénicité et d'immunogénicité. D'autres antigènes de PM = 45 et 50 kD sont reconnus simultanément par les IgM des sérums des patients qui auraient atteint le stade chronique ou non évolutif de la maladie.

En plus de ces fractions importantes, les IgM reconnaissent 8 autres composants antigéniques.

Tous les sérums trouvés positifs en IgM par les techniques de routine (IF - HA(2ME)) le sont aussi par la technique du blotting. Mais, celle-ci apporte d'autres renseignements intéressants pour donner un diagnostic correct.

Ainsi, le sérum 3160, sur lequel subsistaient des incertitudes de lecture en IF quant à la positivité en IgM, montre par le blotting une négativité en IgM.

De plus, certains sérums (478-1236-2529-2745-2849) trouvés négatifs par IF présentent une positivité en IgM par le Western blot. La particularité des sérums 1236-2529 est de présenter un titre élevé en IgG. Les techniques de routine, par contre, donnent une réponse faussement négative.

10.4. Les IgA

Les antigènes ubiquitaires sont reconnus aussi bien par les IgA d'un sérum négatif que par celles d'un sérum positif en anticorps toxoplasmiques avec comme seule différence, l'amplification de la réaction Ag-Ac dans le cas d'un sérum positif en anticorps toxoplasmiques.

Les IgA reconnaissent de nombreuses fractions communes aux IgM. Cette similitude est à mettre en relation avec leur apparition au cours de l'évolution de la maladie. En effet, les IgA apparaissent très tôt avec les IgM pour protéger l'individu contre la multiplication des trophozoïtes.

La fraction de PM = 67 kD est reconnue par le sérum 478 qui est un sérum d'immunisation. Toutefois, cette remarque n'est pas constante.

La fraction de PM = 28 kD est reconnue par les sérums dont les titres en IgG sont assez élevés.

<u>sérums</u>	<u>IF (IgG)</u>	<u>HA</u>
2745	6400	8192
3894	1600	4096
2412	400	4096

L'association des 2 fractions de PM = 5 à 11 kD et 25 kD signifierait que le patient développe une maladie évoluant vers la chronicité.

L'intensité de la révélation des IgA est proportionnelle à la quantité d'IgG et IgM. D'une manière générale, tous les sérums positifs en IgM ainsi que certains sérums avec un titre élevé en IgG sont positifs en IgA.

La fraction de PM = 20 kD reconnue par les IgA est caractéristique du sérum 1068 dont le titre en IgM atteint un maximum.

De plus, les IgA reconnaissent 6 autres composants antigéniques.

Les antigènes de PM = 22,5 et 25 kD, ainsi que de PM = 35 et 43 kD sont reconnus simultanément par les IgA. Cela traduit, soit une présence d'épitopes communs dans les fractions antigéniques, soit une présence simultanée de 2 IgA différentes reconnaissant les antigènes.

Un sérum de titre élevé en IgG (3894) présente une positivité en IgM et une négativité en IgA.

Par contre, certains sérums (5431-2833) présentent une négativité en IgM et une positivité en IgA.

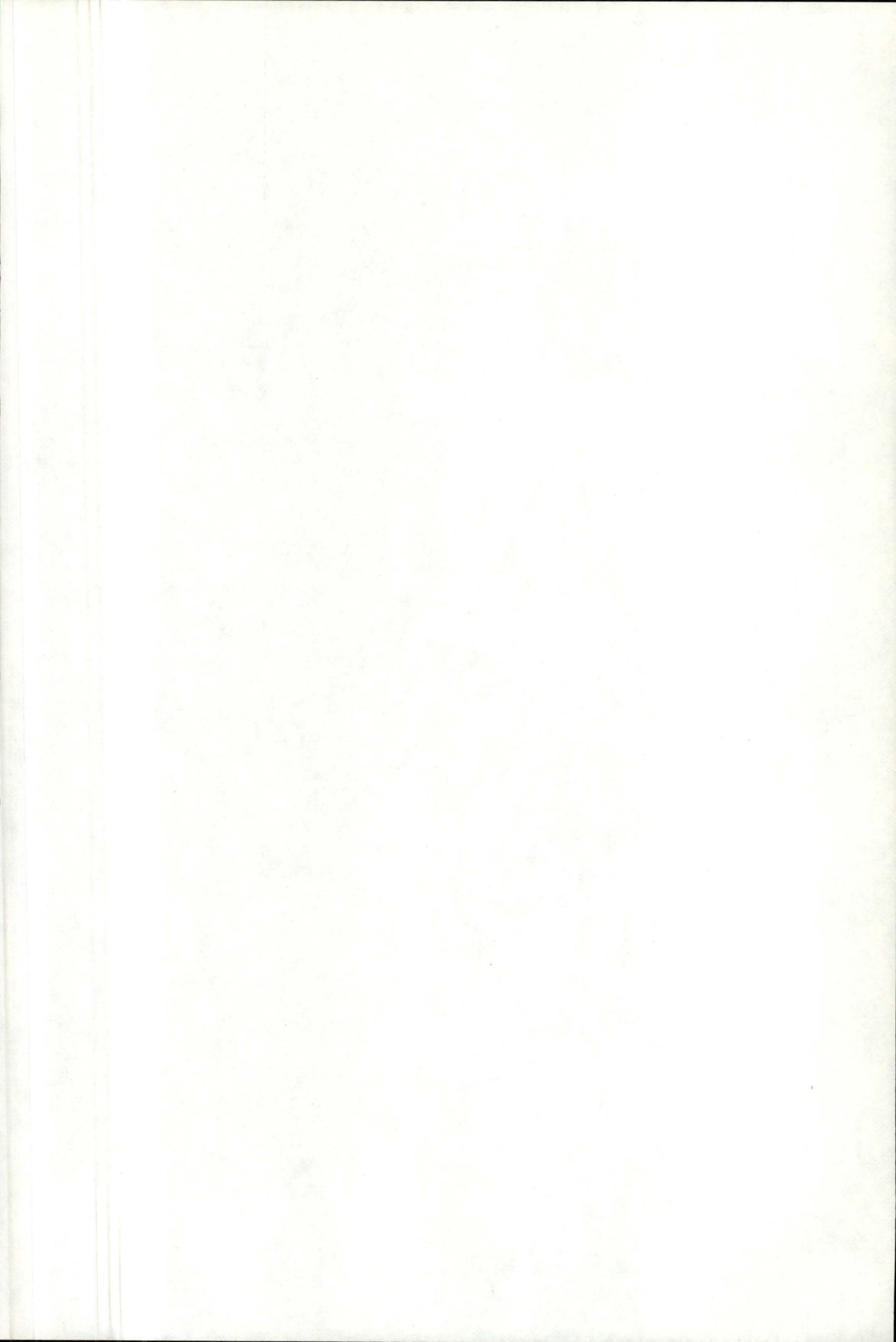
Cette différence temporelle dans la protection par les IgA ne pourrait-elle pas traduire un mode de pénétration différent du trophozoïte? (32)

10.5. Les IgE.

Nous n'observons pas d'anticorps naturels de la classe des IgE. Le sérum 2745 reconnaît des antigènes dans un cas alors que dans l'autre cas, aucune réaction n'est perceptible. L'explication réside dans la qualité du conjugué anti-IgE. La faible concentration en IgE dans les sérums nécessite donc un conjugué de bonne qualité, spécifique et sensible. Un conjugué commercial de bonne qualité a été utilisé dans la détection d'IgE dans le sérum 2745*.

La faible concentration en IgE dans les sérums nécessite un volume assez important de sérum. De ce fait, le nombre de sérums testés a été limité.

La présence d'IgE est révélée dans les sérums 2745-3938-2849 qui caractérisent la phase aiguë. Par contre, la phase chronique ne présente apparemment pas d'IgE.



10.6. Les IgG.

De nombreuses fractions de faible PM, communes aux IgM et IgA, réagissent avec les IgG (46). Mais les IgG sont dirigées contre un plus grand nombre de fractions antigéniques et parmi celles-ci, nous observons des fractions de PM plus élevé.

Une gradation, tant dans le nombre de fractions réactives que du point de vue du PM, est observée dans les sérums positifs en IgM. Ainsi, plus le titre en IgM est élevé, moins de fractions antigéniques sont reconnues par les IgG et celles qui le sont, présentent un PM assez faible.

<u>sérums</u>	<u>titre en IgM (IF)</u>	<u>observations</u>
1068	640	Peu d'Ag réagissent avec les IgG.
3938	160	Un peu plus d'Ag réagissent avec les IgG.
3894	40	Le nombre d'Ag réagissant avec les IgG est important et ils ont un PM plus élevé.
2745	VN	Les IgG reconnaissent un maximum d'Ag et une fraction de PM = 32 kD.

Cette gradation montre que les IgM reconnaissent les antigènes de surface. Les IgG atteignent plus tardivement un taux protecteur; en effet, elles reconnaissent les autres antigènes principalement d'origine cytoplasmique et métabolique.

Ainsi, au début de la maladie, les trophozoïtes sont intacts et donc les IgM reconnaissent les quelques antigènes de surface. Lors de l'évolution de la maladie, les trophozoïtes éclatent et libèrent de nombreuses autres protéines antigéniques. Les IgG qui atteignent un taux suffisant, les reconnaissent ainsi que les antigènes de surface.

../..

Les réactions Ag-Ac sont bien marquées pour les fractions de PM = 14 → 45 kD. La production importante d'anticorps est donc le reflet de leur important pouvoir d'immunogénicité.

Les fractions de PM = 5 à 11 kD sont reconnues par les IgG des sérums 1236-2412 et les positifs en IgM.

Deux antigènes de PM = 29 et 35 kD sont reconnus uniquement par les IgG des sérums positifs en IgM et du sérum 2529 (négatif en IgM par IF et positif en IgM par blotting). Ces 2 fractions antigéniques sont insolubles et reconnues très tôt.

Les antigènes de PM = 5 à 11 et 15 kD, 22,5 et 25 kD et 45,5 et 55 kD présentent des fractions antigéniques communes ou reconnues en commun.

Les IgG reconnaissent 18 autres composants antigéniques et une zone, contenant plusieurs antigènes de PM allant de 61 kD à 90 kD, est reconnue.

10.6.1. Les IgG (F(ab')₂).

Les profils reconnus par les conjugués constitués d'IgG entières et d'IgG (F(ab')₂) sont semblables. La réaction Ag-Ac est bien spécifique et nous pouvons exclure les réactions aspécifiques. Toutefois, des fractions antigéniques de PM = 22,5 et 58 kD ne sont plus reconnues par les IgG (F(ab')₂) dans le seul sérum 478.

10.7. Reconnaissance antigénique.

Les antigènes reconnus :

par les 4 classes d'Ig :	5 → 11 kD	I	Mb	
	22,5	I	Mb	
par 3 classes d'Ig :	15	I	Mb	MEG
	35	I	Mb	AEG
	25	S		} MAG
	32	S		
	50	S		
	<u>67</u>	S		
par 2 classes d'Ig :	20	I		AG
	28	I	Mb	AE
	29	I		AG
	43	I	Mb	AG
	45	S		} MG
	61	I		
	73	I		
	83,5	S		
	58	I		
par 1 classe d'Ig :	55	S		} G
	<u>91</u>	I		
	103	I		
	118	S		
	125,5	S		
	137	S		
	152	S		
	39,5	S		
	<u>36,5</u>	S		

.../...

Les IgM et IgA reconnaissent principalement les antigènes insolubles de la membrane et quelques antigènes solubles. Elles apparaissent les premières alors que le trophozoïte est encore entier.

Les IgG reconnaissent les antigènes solubles du cytoplasme en plus des antigènes membranaires. Elles apparaissent alors que l'intégrité du trophozoïte est, soit intacte, soit rompue. (32,46).

Les antigènes de PM = 5 à 11 kD et 22,5 kD ont un grand pouvoir d'immunogénicité et d'antigénicité et ce, malgré leur faible PM.

10.8. Cas d'un sérum particulier (3088).

Ce sérum présente un facteur rhumatoïde titré à une valeur très élevée. Il contient donc des IgM anti-IgG pouvant donner des résultats faussement positifs en IF. Les tests de routine révèlent une absence d'IgM et un titre en IgG moyen.

<u>Ag (kD)</u>	<u>IgM</u>	<u>IgA</u>	<u>IgG</u>
5 11	x	x	x
15			x
22,5	x	x	x
25		x	x
39,5			x
45			x
50			x
55			x
61 90			x
91			x
103			x
118			x
125,5			x
137			x

Le blotting montre une positivité en IgM et IgA avec reconnaissance unique des protéines de faible PM. Par contre, les IgG reconnaissent les protéines de PM moyen et élevé.

10.9. Conclusions.

Une meilleure séparation des constituants antigéniques du toxoplasme nous a permis de montrer que les sérums pathologiques contiennent différentes Ig dirigées contre un grand nombre de ces fractions antigéniques. Ces antigènes ont été caractérisés (PM, nature, propriétés).

La technique du blotting montre que :

- Le sérum d'une personne non immunisée présente des anticorps naturels des classes IgM (9-37-53), IgA et IgG qui reconnaissent certaines fractions antigéniques ubiquitaires présentes aussi chez Toxoplasma gondii. Un sérum d'immunisation présente, en plus de ces anticorps naturels, des anticorps spécifiques dirigés contre d'autres antigènes spécifiques du toxoplasme.
- Les IgM et IgA reconnaissent les antigènes membranaires (insolubles).
Les IgG reconnaissent les antigènes cytoplasmiques (solubles) et les membranaires.
- Certains sérums négatifs en IgM par IF présentent une positivité IgM en blotting. Cette constatation reflète la plus grande spécificité du blotting; une des explications serait l'existence de faux-négatifs par compétition entre les IgG et les IgM.

Cette dernière hypothèse a fait l'objet de notre étude et n'a pas pu être retenue. Si, dans ces cas, ces sérums sont débarrassés par précipitation de leur IgG, la recherche d'IgM spécifique par IF est négative. La compétition IgG-IgM n'existe donc pas dans ce cas et nous devons suspecter autre chose. En fait, les résultats suivants indiqueraient qu'il s'agit d'une reconnaissance par les IgM d'antigènes différents.

L'IF utilise des trophozoïtes entiers; les IgM du sérum reconnaissent donc les antigènes membranaires directement accessibles. Par contre, le blotting et l'HA utilisent un ultrasonnat de trophozoïtes. Les IgM reconnaissent alors des antigènes non directement accessibles. Ces IgM apparaissent donc plus tard après la contamination quand les trophozoïtes ont été lysés.

La confirmation nous est apportée par les titres en IgM obtenus par HA après le même traitement de précipitation des IgG par un antisérum anti-IgG humaines. En effet, dans la technique par HA, les hématies utilisées sont préalablement sensibilisées par des antigènes aussi bien cytoplasmiques que membranaires.

<u>Avant traitement</u>				<u>Après traitement</u>		
<u>Sérums</u>	<u>IF(M)</u>	<u>IF(G)</u>	<u>HA</u>	<u>IF(M)</u>	<u>IF(G)</u>	<u>HA</u>
2529	VN	6400	16000	0	0	640
2745	VN	6400	8192	0	0	20

La poursuite de ce travail sur un plus grand nombre de sérums positifs à titre élevé en anticorps aurait le mérite d'évaluer l'évolutivité de la maladie, son pronostic et l'opportunité d'une thérapeutique.

- Indirectement, il est montré que la cinétique des IgM présentée auparavant (p.37) était une courbe théorique qui pouvait varier d'un patient à l'autre. En effet, la persistance d'IgM par blotting au cours de la phase subaiguë montre que la disparition des IgM peut intervenir après 4 mois, 1 an et même après 2 ans 1/2 (cas reconnu sur les différents sérums d'un patient suivi au Centre Hospitalier Reine Fabiola à Auvelais). Le taux d'IgM reste bas pendant tout ce temps et une pathologie viscérale ou hépatique est à craindre.

- La sérologie peut situer avec plus de précision et de certitude la phase évolutive de la maladie.

XI. PERSPECTIVES D'AVENIR : UN VACCIN ?

A l'heure actuelle, il n'existe pas encore de vaccin antitoxoplasmique mais les recherches dans ce domaine progressent. Elles se fondent sur une meilleure connaissance de la physiologie et de l'immunologie du toxoplasme.

De plus, la purification et la caractérisation des composants antigéniques sont devenues possibles grâce aux anticorps monoclonaux et ce, à partir de techniques de blotting et de chromatographie d'affinité.

Ces anticorps monospécifiques, obtenus par la technique de Köhler et Milstein (44) reconnaissent, soit des antigènes membranaires, soit des antigènes cytoplasmiques, soit des antigènes membranaires et cytoplasmiques. Ils ont permis de réaliser la carte antigénique du toxoplasme et de déterminer la nature et la fonction des différents antigènes; ce ne sont encore que les prémices d'une étude qui s'avère longue.

Différents essais d'immunisation ont été réalisés mais les résultats sont encore peu nombreux.

11.1. Immunisation active.

L'immunité active est caractérisée par une installation lente et par un équipement cellulaire spécifique durable. De plus, les lymphocytes peuvent être rapidement restimulés par une structure spécifique (mémoire immunologique). Les différentes possibilités d'immunisation active se basent sur l'injection d'une structure spécifique du parasite. La seule différence réside dans la forme de la préparation à injecter.

- Il est possible de vacciner des chèvres contre la toxoplasmose en leur injectant des coccidies non pathogènes, Hammondia hammondi et H. heydoni (12).

../..

- Pour Toxoplasma gondii, il existe différentes souches dont la virulence est variable. Des essais d'immunisation active avec des souches avirulentes ou peu virulentes ont été réalisés. Mais, il est difficile de déterminer la virulence d'une souche pour une espèce animale donnée. Les différentes formes évolutives (kystes - oocystes) ont un comportement différent selon leur voie d'inoculation. Toutefois, le pouvoir de pré-immunisation de la souche RH vis-à-vis des autres souches s'est avéré très efficace.

- La technique d'immunisation par radio-vaccin est encore peu usitée et les résultats présentés sont souvent contradictoires (48).
 - Des trophozoïtes fortement irradiés (dose de 10 Krad) et donc inactivés peuvent être immunisants dans certaines conditions. Cette immunité est cependant de courte durée (inférieure à 4 semaines).
 - Des trophozoïtes faiblement irradiés (dose de 6 Krad) mais de manière répétée procurent une bonne immunisation. Un allongement d'une vingtaine de jours de la durée de survie des animaux est observé. De plus, les survivants résistent à une inoculation d'épreuve 25 jours après l'inoculation immunisante.

- Des antigènes cytoplasmiques et membranaires de toxoplasme partiellement purifiés peuvent protéger une souris contre l'infection. Cette protection est complète s'ils sont administrés avec un adjuvant complet de Freund (3).

- Des extraits de RNA de Toxoplasma gondii (souche RH) sont capables d'induire une réaction d'hypersensibilité retardée chez les souris (24).

L'immunisation se déroule en plusieurs étapes.

- Une première injection de RNA toxoplasmique incorporé dans un volume égal d'adjuvant complet de Freund est réalisée par voie intramusculaire.
- Deux semaines plus tard, une seconde injection de RNA toxoplasmique avec un adjuvant incomplet de Freund est réalisée.
- Une semaine après, des antigènes ou du RNA toxoplasmiques sont injectés. Une réaction inflammatoire et un oedème sont observés en même temps qu'une infiltration de mononucléaires.

L'injection d'extraits de RNA toxoplasmique serait peut-être une solution aux problèmes causés par la pathologie toxoplasmique. En effet, l'injection de RNA stimule l'immunité cellulaire et l'élimination du toxoplasme est plus rapide. Cette lyse du toxoplasme est plus efficace si l'immunité cellulaire et l'immunité humorale jouent leur rôle protecteur au maximum.

L'immunité cellulaire est donc très importante dans la lyse d'un parasite intracellulaire. En effet, les anticorps ne peuvent pas pénétrer dans les cellules en raison de leur grande taille; ce seront donc des cellules spécialisées dans les réactions cytotoxiques et phagocytaires qui agiront. Les lymphocytes libèrent des lymphokines et d'autres substances qui peuvent activer les macrophages.

11.2. Immunisation passive.

L'immunisation passive est caractérisée par une installation rapide et par une persistance courte des Ig.

- Le transfert passif d'anticorps monoclonaux réagissant avec les antigènes de surface du toxoplasme peut conférer à l'hôte une résistance contre l'infection avec des souches de faible virulence (45).
- De manière à obtenir une immunisation rapide et durable, une sérovaccination peut être envisagée. Une injection de RNA serait faite ainsi qu'un transfert passif d'Ig spécifiques couplées ou pas à des protéines du toxoplasme. Celles-ci seraient dirigées contre des antigènes spécifiques et indirectement responsables d'une synthèse accrue d'anticorps.

XII. CONCLUSION

Ces dernières années, les études ont précisé l'importance de la toxoplasmose congénitale et ont défini l'ensemble des mesures prophylactiques pouvant être opposées à cette maladie. Pour l'essentiel, ces mesures préventives reposent sur les résultats d'examen sérologiques auxquels, suivant le moment où ils sont pratiqués, on demande finalement 2 types d'indications très différentes.

Pour les contrôles sérologiques effectués chez des jeunes femmes non enceintes, l'objectif est, en effet, de reconnaître les sujets disposant d'une immunité antérieurement acquise (résultats qualitatifs). Au contraire, chez des femmes enceintes, jusque là négatives ou non contrôlées, ou bien encore chez des nouveaux-nés suspects, la sérologie doit fournir des indications diagnostiques précises, avec une notion d'évolutivité dont on déduira la conduite thérapeutique (résultats quantitatifs).

De nombreuses techniques sérologiques existent et les laboratoires les utilisent quotidiennement. Toutefois, certaines diffusent mal dans le domaine de l'application et il semble bien que la cause en soit une carence en antigènes spécifiques. Cette carence est une des principales causes des difficultés rencontrées dans la détection de l'immunité toxoplasmique par intradermo-réactions. Dans le cadre de la prévention de la toxoplasmose congénitale, elles pourraient constituer une solution très commode lorsqu'il est seulement nécessaire d'obtenir des réponses qualitatives (femmes immunisées ou non). Différents extraits d'antigènes (toxoplasmine) ont été essayés mais ce test n'est pas encore systématique comme dans le cas de la tuberculose.

Les recherches d'un vaccin se basent aussi sur une meilleure connaissance de la mosaïque antigénique du toxoplasme. L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide y contribue ainsi que la double coloration (argent/bleu de Coomassie) qui, par sa sensibilité, permet de caractériser les fractions antigéniques du toxoplasme.

De plus, l'utilisation du Western blot permet la détection des antigènes spécifiques de Toxoplasma gondii contre lesquels sont dirigés des anticorps IgG et IgM formés pendant l'infection aiguë. La méthode est très sensible pour cette utilisation, et des antigènes spécifiques ont été identifiés contre lesquels l'hôte humain répond lors de l'infection aiguë et chronique. Ces antigènes pourront être utilisés pour développer des méthodes sérodiagnostiques plus sensibles et plus spécifiques; ils permettraient d'étudier leur action sur la réponse immunitaire humorale et cellulaire vis-à-vis de Toxoplasma gondii.

Cette technique du Western blot associe une électrophorèse, un transfert et une réaction immunoenzymatique.

- L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en gradient concave et en présence de SDS sépare un plus grand nombre de fractions protéiques du toxoplasme, en fonction de leur poids moléculaire.
- Le transfert est nécessaire pour la détection immunologique des antigènes. En effet, les anticorps ne peuvent pas pénétrer dans le gel et donc, la reconnaissance immunologique n'est pas possible. Les antigènes sont liés en surface sur la nitrocellulose où ils sont faciles d'accès. La réaction, étant spécifique, il n'est pas nécessaire d'isoler et de purifier les constituants biologiques.

- La réaction immunoenzymatique possède une grande sensibilité (± 100 pg) et détecte les différentes immunoglobulines dirigées contre la mosaïque antigénique.

Notre étude des anticorps présents dans les différents sérums caractérisant les différents stades évolutifs de la maladie nous montre que les tests sérologiques de routine sont fortement dépendants de la nature des antigènes utilisés. De plus, la reconnaissance des fractions antigéniques évolue dans le temps selon le poids moléculaire, la localisation des antigènes et l'état des trophozoïtes (entiers ou lysés).

La positivité en IgM trouvée par blotting dans certains sérums négatifs en IF nous a ouvert une voie d'étude. La possibilité d'un résultat faussement négatif n'est pas retenue, après une recherche d'IgM par IF dans un sérum débarrassé de ses IgG. Les titres en IgM par HA sur ces mêmes sérums traités indiqueraient qu'il s'agit d'une reconnaissance d'antigènes différents par les IgM.

La technique du blotting présente un intérêt particulier dans le diagnostic immunologique de la toxoplasmose congénitale. En effet, le diagnostic, dans ce cas, est difficile en raison de la relation mère-enfant et de la situation imprécise qui en résulte chez l'enfant où les anticorps maternels transmis peuvent masquer temporairement les néo-anticorps. Une technique d'ELIFA (enzyme-linked-immuno-filtration-assay) permet de distinguer les anticorps maternels transmis et les anticorps foetaux néo-formés par comparaison des profils immunologiques. Le blotting peut aussi montrer des profils immunologiques différents traduisant des périodes d'infestation différentes ainsi que des immunoglobulines de spécificité différente.

Les progrès dans le domaine des connaissances de la toxoplasmose ainsi que sur le plan technique donneront aux biologistes des bases plus sûres pour diagnostiquer une toxoplasmose congénitale ou acquise.

T E C H N I Q U E S

Matériel

Bis acrylamide	Bio Rad	N ^o 161-0200
Acrylamide	Bio Rad	N ^o 161-0100
Persulfate d'ammonium	Bio Rad	N ^o 161-0700
TEMED	Bio Rad	N ^o 161-0800
Trans-blot [®] transfer medium (pure nitrocellulose membrane) 0,45 m μ	Bio Rad	N ^o 162-0116
Peroxidase conj. goat anti-human IgM antibody (Mu ch. sp.)	Tago, INC	N ^o 2392
Peroxidase conj. goat anti-human IgE antibody (Epsilon ch. sp.)	Tago, INC	N ^o 2394
Peroxidase conj. goat anti-human IgG antibody (Gamma ch. sp.)	Tago, INC	N ^o 2390
Peroxidase conj. goat anti-human IgG(F(ab) ₂) antibody	Tago, INC	N ^o 4500
Peroxidase conj. goat anti-human IgA antibody	Bio-Yeda	

I. Résolution de l'antigène toxoplasmique en PAGE SDS

1. Réactifs.

- Tampon TRIS pH8,35

TRIS : 43g

H₃BO₃: 20,16g

EDTA : 3,72g

H₂O → 4 litres

- Tampon TRIS pH 8,35 SDS 0,2%

Tampon TRIS 8,35 + 2g SDS/l

- Préparation de l'acrylamide à 20%

19,47g d'acrylamide

0,53g BIS acrylamide

} porter à 100ml avec du
tampon

} TRIS pH 8,35 SDS 0,2%

conservation à 4°C

- Préparation des solutions pour le gradient concave
(4% - 20%)

solution à 4% : 8,4 ml acrylamide 20%

33,6 ml tampon TRIS pH 8,35

SDS 0,2%

210 µl persulfate d'ammonium 10%

21 µl TEMED

solution à 20% : 10,5 ml acrylamide 20%

52,5 µl persulfate d'ammonium 10%

5,25 µl TEMED

.../...

- Les différents réactifs doivent être à la température du laboratoire pour l'utilisation.
- La solution de persulfate d'ammonium 10% doit être préparée extemporanément.
- Tampon de dilution pour les antigènes toxoplasmiques (280 mg/°)

1 volume d'antigènes toxoplasmiques

1 volume SDS 2%

1 volume sucrose

25 μ l bleu de bromophénol

L'antigène est dilué au 1/3.

La solution est chauffée à 45°C pendant 10 minutes.

L'entièreté de la solution est déposée sur le gel.

Le dépôt dans une alvéole est de 25 μ l et sur la surface du gel de 1,5 ml.

2. Protocole expérimental pour couler un gel.

- Réaliser le montage et préparer le gradient " former " pour qu'il soit opérationnel.
- Préparer les solutions à 4% et 20% et laisser le temps d'amener à la température du laboratoire.
- Dégazer pendant 15 minutes sous 125 torr au moins.
- Ajouter le TEMED et le persulfate d'ammonium 10%. Mélanger par rotation.
- Verser la solution à 20% dans la chambre de mélange (volume 1/4)
verser la solution à 4% dans la chambre " réservoir " (volume 4/4)
- Mettre le piston à 1cm au-dessus de la surface de la solution à 20%.
- Brancher l'agitateur magnétique pour que le mélange soit homogène.
- Ouvrir simultanément le robinet de sortie et la communication entre les 2 chambres. Laisser couler l'acrylamide entre les 2 plaques.
- Quand le gel est coulé, introduire le peigne en évitant les bulles d'air.
N.B. Dans notre cas, nous n'avons pas mis le peigne pour obtenir une surface plane.
- Après 15 minutes, mettre une solution saturée en isobutanol à 30% (200 μ l) au-dessus du gel pour éviter qu'il n'entre en contact avec l'air; en effet, l'oxygène est le principal ennemi de la polymérisation.

../..

- Laisser polymériser 2 heures à température ambiante.
- Après polymérisation, le gel peut être conservé au frigo à 4°C dans un essuie-tout imbibé de tampon TRIS pH 8,35 SDS 0,2% pendant une semaine maximum.

3. Procédure pour l'électrophorèse.

- Après polymérisation, le gel est placé dans la cuve.
- Mettre du tampon TRIS pH 8,35 SDS 0,2% dans le compartiment inférieur jusqu'à \pm 1 cm au-dessus de la base du gel.
- Mettre du tampon TRIS pH 8,35 SDS 0,2% dans le compartiment supérieur jusqu'au bord.
N.B. Lors de la migration, veiller à conserver un niveau de tampon suffisant.
- Mettre en route la réfrigération et l'agitateur magnétique.
- Réaliser une pré-électrophorèse à 150 Volts pendant 1 heure pour équilibrer le gel et éliminer les réactifs en excès de la polymérisation (surtout le persulfate d'ammonium).
- Déposer l'échantillon uniformément.
- Réaliser la migration à 150 Volts pendant 4h15 à 4h30 environ.
N.B. Nous arrêtons la migration quand le bleu de bromophénol se trouve à 1 cm de la base du gel.

II. Transfert sur nitrocellulose des composantes
protéiques de l'antigène.-----

1. Réactifs.

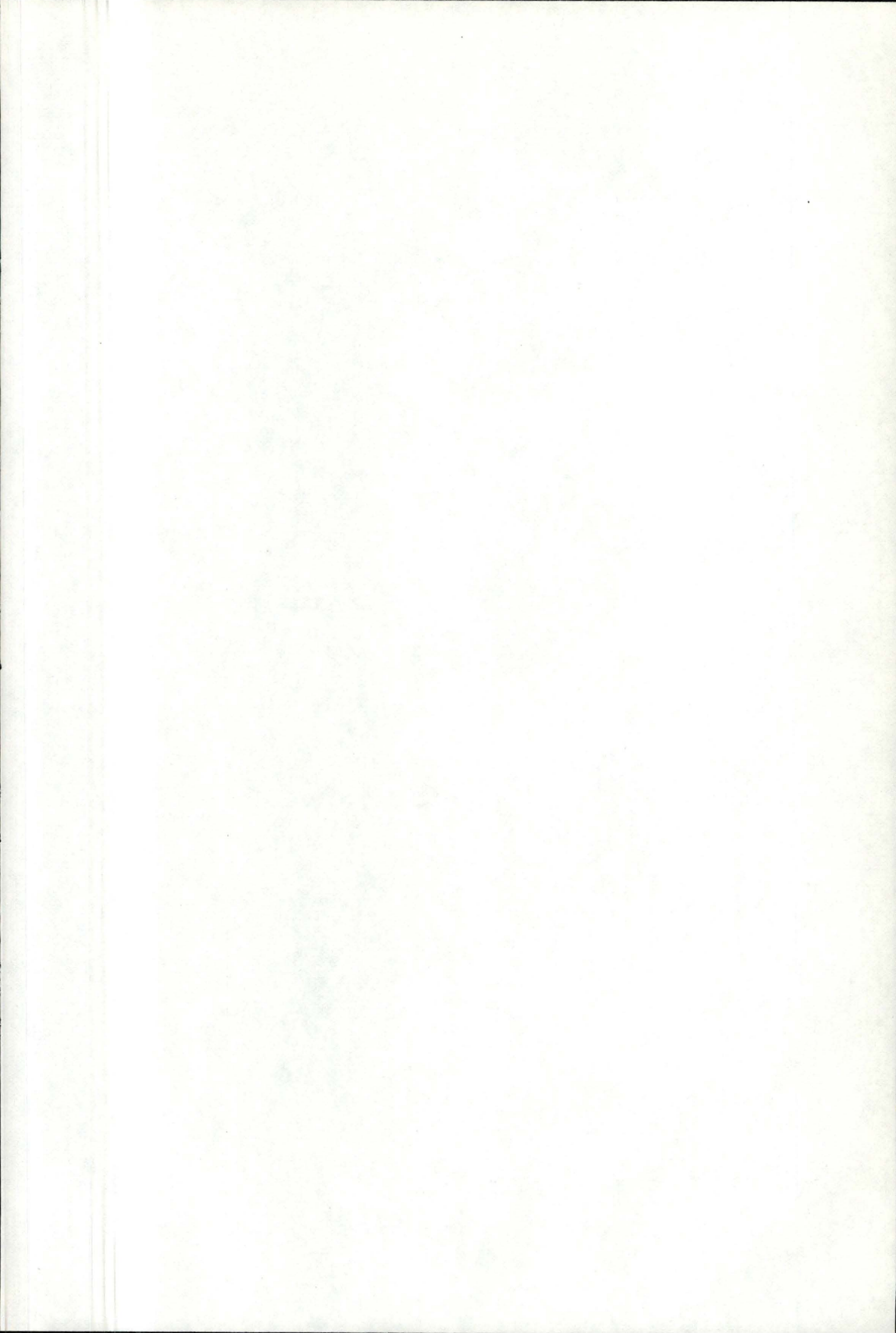
- Tampon TRIS (25 mM) glycine (192 mM) pH 8,3
 - TRIS : 3,03g/1
 - glycine : 14,4g/1
 - méthanol : 20% v/v
 - . conservation à 4°C
 - . ce tampon ne peut pas être utilisé plus de 10 fois.

- Solution de BSA à 5%
 - 50g BSA/1 de TBS
 - Cette solution est conservée à 4°C pendant quelques jours.

- TBS 6,05g/1 TRIS
 - 29,22g/1 NaCl
 - 39,9 ml HCl(N) } Ajuster à pH 7,5 avec HCl(N)

2. Procédure générale pour le western blot.

- Electrophorèse du gel.
- Après démoulage du gel, l'équilibrer dans le tampon TRIS glycine (20% méthanol) pH 8,3 ainsi que les papiers filtres pendant 20 minutes.
- Après 15 minutes, immerger également la feuille de nitrocellulose pendant 5 minutes.
- Tremper les éponges dans le tampon TRIS glycine (méthanol) pH 8,3.
- Réaliser le "sandwich" :
 - a) déposer le gel et son papier filtre sur une éponge.
 - b) appliquer la feuille de nitrocellulose sur le gel et aplatir avec une pipette pour éviter les bulles d'air qui entravent le transfert.
 - c) ajouter un papier filtre, l'aplatir à nouveau et placer une éponge.



- Placer l'assemblage dans la cuve de manière à ce que le gel soit du côté de la cathode (-) : disque noir et la nitrocellulose du côté de l'anode (+) :
disque rouge
- La cuve se compose d'une électrode fixe et d'une électrode mobile entre lesquelles se place le "sandwich".
- L'électroblotting a lieu de la cathode vers l'anode.
- Remplir la cuve de tampon TRIS glycine (méthanol) pH 8,3.
- Brancher l'agitateur magnétique et le système de refroidissement (10°C).
- Le transfert a lieu à 190 mA pendant 3 heures.

Notes pratiques.

- Les papiers filtres, la nitrocellulose et le gel doivent avoir les mêmes dimensions.
- L'immersion de la nitrocellulose doit être faite avec précaution.
Afin d'éviter les bulles d'air, il faut déposer la feuille de nitrocellulose sur la solution de tampon et laisser humidifier par capillarité; quand elle est entièrement humide, l'immerger complètement.
- Le tampon TRIS glycine pH 8,3 contient du méthanol.

- Ses avantages :
- il tend à augmenter la capacité de liaison de la nitrocellulose pour les protéines.
 - il stabilise la géométrie du gel durant le transfert.

Ses inconvénients :

- il réduit l'efficacité de l'éluion pour les protéines sur le gel de polyacrylamide SDS.
- Après le transfert, la nitrocellulose est immergée dans du TBS 2x10 minutes.
- Mettre la nitrocellulose dans une solution de BSA à 5% pendant 1 heure à température ambiante.
- La nitrocellulose est rincée au TBS et est gardée dans ce tampon à 4°C.
Elle est coupée en bandes de 0,5 cm de largeur et de 15 cm de longueur.
- Il est à noter que certaines étapes de la technique doivent se succéder sans interruption ; c'est le cas

pour la préélectrophorèse	(1 heure)
l'électrophorèse	(41/2 heures)
le transfert	(3 heures)
la saturation de la nitrocellulose	(1 heure)
- Après le transfert, la nitrocellulose peut être colorée au Noir Amide 0,1%/25% isopropanol /10% acide acétique et ce, pendant 8 minutes.
La décoloration à l'isopropanol 25%/HAc 10% dure environ une nuit.

support plastic

éponge

papier filtre

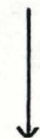
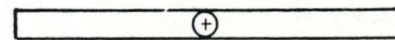
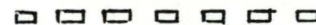
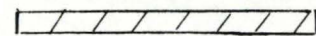
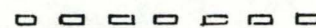
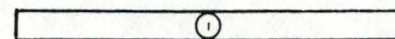
gel

nitrocellulose

papier filtre

éponge

support plastic



électroélution

III. Réaction avec le sérum humain et enzyme immuno essai.

1. Réactifs.

- TBS : 6,05g/l TRIS
29,22g/l NaCl
39,9 ml/l HCl (N) } Ajuster à pH 7,5
avec HCl (N)
- Solution de BSA 0,5% dans du TBS
5g BSA/l de TBS
- Sérums humains
- Conjugués de chèvre anti-Ig humaines
- Solution de révélation : A. 20ml méthanol + 60 mg
HRP color development
(4 chloro-1-naphtol)
B. 100 ml TBS + 60 μ l H₂O₂ 30%
mélanger A et B

N.B. Ces deux solutions sont préparées au moment de l'utilisation.

2. Mode opératoire.

- La nitrocellulose est incubée avec le sérum dilué
 - au 1/25 pour les Ig A, Ig M, Ig G
 - au 1/5 pour les Ig Edans la BSA 0,5%.
L'incubation a lieu pendant une nuit à T° ordinaire sous agitation.
- Nous lavons les bandes de nitrocellulose avec du TBS, 3 x 10 min après un rinçage rapide.
- Nous incubons la nitrocellulose avec le conjugué anti Ig-PO.
 - Les conjugués sont dilués dans la BSA 0,5%
 - au 1/400 pour IgM et IgE
 - au 1/600 pour IgG
 - au 1/1000 pour IgA
 - L'incubation a lieu pendant 4h à T° ordinaire sous agitation.
- Nous lavons la nitrocellulose avec du TBS, 3 x 10 min après un rinçage rapide.
- Nous ajoutons la solution de révélation pendant 10 min. Ensuite, nous stoppons la réaction avec de l'eau.
- Nous photographions les résultats et nous identifions les fractions immunogènes.

Notes pratiques :

- La bande de nitrocellulose doit être immergée avec la face où sont fixés les Ag, vers le haut.
- Les résultats des tests sont fortement dépendants des sérums et des conjugués. Il faut donc veiller à utiliser des sérums non contaminés et des conjugués de bonne qualité.
- Les durées d'incubation peuvent être réduites à 1h.

IV. Préparation des standards Poids Moléculaires des protéines.-----

Nous avons utilisé les poids moléculaires standard (Bio-Rad) pour PAGE SDS. Nous disposons de 2 échantillons dont l'un était représenté par les poids moléculaires faibles et l'autre par les poids moléculaires élevés.

Chaque échantillon contient $200\mu\text{l}$ de protéines standard dans une solution glycérol à 50%.

La concentration approximative de chaque protéine est de 2 mg/ml.

L'échantillon est dilué au 1/20 dans un tampon contenant

du : Tampon TRIS pH 8,35
 1% SDS
 0,1M dithiothréitol
 10% glycérol
 0,001% bleu de bromophénol

Les protéines sont dénaturées par incubation à 100°C pendant 5 minutes.

Nous déposons $25\mu\text{l}$ de chaque échantillon sur le gel.

V. Technique de double coloration.1. Réactifs.

- Solution de fixation :
méthanol 40% - acide acétique 10%
- Solution de lavage du SDS :
éthanol 10% - acide acétique 5%
- Oxydant :
dichromate de potassium ($K_2Cr_2O_7$) 3,4mM +
acide nitrique (HNO_3) 3,4 mM
10,003g/l $K_2Cr_2O_7$ + 2,1429/l HNO_3 diluant : H_2O
 - . diluer au 1/10 pour l'usage
 - . à préparer extemporanément
 - . conservation à 4°C
- Solution de nitrate d'argent :
nitrate d'argent ($AgNO_3$) 12 mM
20,384g/100ml $AgNO_3$ diluant : H_2O
 - . diluer au 1/100 pour l'usage
 - . à préparer extemporanément
 - . conserver à l'obscurité à 4°C
- Révélateur :
carbonate de sodium (Na_2CO_3) 0,28 M dans formol 2,2%
29,68g/l Na_2CO_3 + 2,26g/l paraformaldéhyde
diluant : H_2O
 - . conservation à 23°C pendant 1 mois
 - . utilisation à une température de 45°C
- Acide acétique : 7,5%

.../...

..//..

- Solution de Farmer :

solution A :

7,5g de ferricyanure de potassium → 100 ml avec H₂O

solution B :

96g de thiosulfate de sodium → 400 ml avec H₂O

solution de travail :

2,5 ml solution A + 10 ml solution B → 250 ml avec H₂O

ou

solution A :

37g NaCl + 37g CuSO₄ dans 850 ml H₂O + hydroxyde d'ammonium concentré jusqu'à ce que le précipité formé se redissolve pour donner une solution bleue porter à 1 litre avec H₂O.

solution B :

436g de thiosulfate de sodium → 1l avec H₂O

solution de travail :

mélanger à part égale les 2 solutions immédiatement avant usage.

- Bleu de Coomassie :

1g/l de bleu de Coomassie R 250

méthanol 40%

acide acétique 10%

- Solution de décoloration :

méthanol 10%

acide acétique 7,5%

2. Protocole expérimental

	<u>Durée</u>
1. Méthanol 40% / acide acétique 10%	1h
2. Ethanol 10% / acide acétique 5%	30 min
3. Ethanol 10% / acide acétique 5%	30 min
4. Oxydant	10 min
5. H ₂ O	10 min
6. H ₂ O	10 min
7. H ₂ O	10 min
8. Réactif à l'argent	30 min
9. H ₂ O	2 min
10. Révélateur	± 1 min
11. Révélateur	± 5 min
12. Rincer à l'eau	
13. Acide acétique 7,5%	5 min
14. Bleu de Coomassie 0,1%	1h
15. Méthanol 10% / acide acétique 7,5%	variable
16. Photographier le résultat.	

.../...

..//..

Notes pratiques

1. Le bain de méthanol 40% / acide acétique 10% sert de fixateur.
Les bains d'éthanol 10% / acide acétique 5% enlèvent le SDS du gel.
2. La durée de chaque bain est fonction de l'épaisseur du gel; dans notre cas, les temps sont valables pour un gel d'une épaisseur supérieure à 1mm.
3. Toutes les solutions sont utilisées à la température du laboratoire sauf le révélateur qui est utilisé à une température de 45°C.
4. Il faut veiller à ce que le gel soit entièrement immergé.
5. Tous les bains sont réalisés sous agitation.
6. Après l'étape n° 13, la solution de Farmer peut être utilisée si le gel présente un dépôt ou une coloration de fond trop importante.
Laisser le gel dans le bain pendant 45 sec, ensuite laver à l'eau.

BIBLIOGRAPHIE

1. P. AMBROISE-THOMAS, M.Y. CAGNARD, M. ROUMIANTZEFF,
G. COLOMBET
Détection de l'immunité toxoplasmique par intradermo-
réactions à l'aide d'exo-antigènes de Toxoplasma gondii.
Lyon Médical, 1982, 248, hors série, 79-83.
2. P. AMBROISE-THOMAS, J. SIMON, M. BAYARD
L'hémagglutination indirecte avec antigène total
mixte, dans le contrôle de l'immunité antitoxoplasmique
et le séro-diagnostic de la toxoplasmose humaine.
Biomédecine, 1978, 29, 245-248
3. F.G. ARAUJO, J.S. REMINGTON
Partially purified antigen preparations of Toxoplasma
gondii protect against lethal infection in mice.
Infect. Immun. 1984, 45, 1, 122-126
4. M.H. BESSIERES-CATHALA
IgE spécifiques et non spécifiques : méthodes
d'évaluation dans la toxoplasmose en méthode E.L.I.S.A.
Lyon Médical, 1982, 248, hors série, 85-88
5. R.G. BROOKS, S.D. SHARMA, J.S. REMINGTON
Detection of Toxoplasma gondii antigens by a
Dot-immunobinding technique.
J. clin. micr., 1985, 21, 1, 113-116
6. M. CALAMEL, M. LAMBERT
La préparation d'antigènes solubles pour le
sérodagnostic de la toxoplasmose par E.L.I.S.A.
Revue Méd. vét., 1983, 134, 6, 341-347
7. J. COUVREUR
Diagnostic d'une toxoplasmose congénitale.
Lyon Médical, 1982, 248, hors série, 125-132

8. A.L. DE BLAS, H.M. CHERWINSKI
Detection of antigens on nitrocellulose paper immunoblots with monoclonal antibodies
Anal. Biochem., 1983, 133, 214-219
9. G. DESMONTS
Les recherches d'anticorps IgM spécifiques par immuno-adsorption
Lyon Médical, 1982, 248, hors série, 37-41
10. G. DESMONTS
Toxoplasmose acquise de la femme enceinte. Estimation du risque de transmission du parasite et de toxoplasmose congénitale.
Lyon Médical, 1982, 248, hors série, 115-123
11. C. FAURANT, F. HEYER, J. LAPIERRE, M.F. TIMBART, L. BEAUJOURN
Les réactions ELISA dans le diagnostic de la toxoplasmose. Etude comparative avec les méthodes classiques.
Médecine et Maladies infectieuses, 1985, 15, 1, 39-42
12. H.A. FELDMAN
Humoral immunity in toxoplasmosis
Lyon Médical, 1982, 248, hors série, 15-20
13. W. FOULON, A. NAESSENS, M. VOLCKAERT, S. LAUWERS, J.-J. AMY
Congenital toxoplasmosis : a prospective survey in Brussels.
British J. Obstet. gynaecol, 1984, 91, 5, 419-423
14. J.K. FRENKEL
Experimental analysis of tissue immunity in toxoplasmosis.
Lyon Médical, 1982, 248, hors série, 67-73
15. J.K. FRENKEL
The coccidia Eimeria, Isospora, Toxoplasma and related genera (1 vol., 494 p., London, 1973, U.P.P.)

16. J.M. GERSHONI
Protein blotting : developments and perspectives.
TIBS, 1985, 21, 103-106
17. Y.J. GOLVAN, P. AMBROISE-THOMAS
Les nouvelles techniques en parasitologie.
1 vol., 308 p., Paris, 1984, Flammarion Médecine
Sciences
18. E. HANDMAN, J.W. GODING, J.S. REMINGTON
Detection and characterization of membrane
antigens of Toxoplasma gondii.
J. immunol., 1980, 124, 6, 2578-2583
19. H.P.A. HUGHES
The antigenic structure of Toxoplasma gondii.
Lyon Médical, 1982, 248, hors série, 135-139
20. H.P.A. HUGHES, F. VAN KNAPEN, H.J. ATKINSON, A.H. BALFOUR,
D.L. LEE
A new soluble antigen preparation of Toxoplasma gondii
and its use in serological diagnosis.
Clin. exp. immunol., 1982, 49, 239-246
21. A.M. JOHNSON, P.J. Mc Donald, S.H. NEOH
Molecular weight analysis of the major polypeptides
and glycopeptides of Toxoplasma gondii.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 1981, 100, 3, 934-943
22. L.H. KASPER, J.H. CRABB, E.R. PFEFFERKORN
Purification of a major membrane protein of
Toxoplasma gondii by immunoabsortion with a
monoclonal antibody.
J. immunol., 1983, 130, 5, 2407-2413
23. L.H. KASPER, K.M. CURRIE, M.S. BRADLEY
An unexpected response to vaccination with a
purified major membrane tachyzoite antigen (P30)
of Toxoplasma gondii.
J. immunol., 1985, 134, 5, 3426-3431

24. C.H. LAI, I.R. TIZARD, P.J. QUINN, D.G. INGRAM
An analysis of those components of Toxoplasma gondii responsible for delayed hypersensitivity reactions in mice.
Immunology, 1975, 28, 611-620
25. J. LYNG, J. Chr. SIIM
The who international standard for anti-toxoplasma serum human.
Lyon Médical, 1982, 248, hors série, 107-108
26. H. MAISONNEUVE
Le test de transformation lymphoblastique dans la toxoplasmose.
Lyon Médical, 1982, 248, hors série, 75-77
27. A. MERLI, A. CANESSA, G. MELIOLI
Enzyme immunoassay for evaluation of Toxoplasma gondii growth in tissue culture.
J. clin. micr., 1985, 21, 1, 88-91
28. D. MILATOVIC, I. BRAVENY
Enzyme-linked immunosorbend assay for the serodiagnosis of toxoplasmosis.
J. clin. pathol., 1980, 33, 9, 841-844
29. Y. NAOT, D.R. GUPTILL, J. MULLENAX, J.S. REMINGTON
Characterization of Toxoplasma gondii antigens that react with human Immunoglobulin M and immunoglobulin G antibodies.
Infect. Immun., 1983, 41, 1, 331-338
30. Y. NAOT, J.S. REMINGTON
Use of enzyme-linked immunosorbend assays (ELISA) for detection of monoclonal antibodies : experience with antigens of Toxoplasma gondii.
J. immunological methods, 1981, 43, 333-341

31. P. PARTANEN, H.J. TURUNEN, R. PAASIVUO, E. FORSBLOM
J. SUNI, P.O. LEINIKKI
Identification of antigenic components of
Toxoplasma gondii by an immunoblotting technique.
FEBS letters, 1983, 158, 2, 252-254
32. P. PARTANEN, H.J. TURUNEN, R.T.A. PAASIVUO, P.O. LEINIKKI
Immunoblot analysis of Toxoplasma gondii antigens
by human immunoglobulins G, M and A antibodies
at different stages of infection.
J. clin. micr., 1984, 20, 1, 133-135
33. Y. PELOUX
Diagnostic sérologique de la toxoplasmose.
Assoc. Anc. El. IPP, 1975, 64, 156-161
34. M. PESTRE-ALEXANDRE, M. MOUNIER
Immunisation active avec les souches avirulentes.
Lyon Médical, 1982, 248, hors série, 95-99
35. J.M. PINON, N. GRUSON
Intérêts des profils immunologiques comparés
E.L.I.F.A. dans le diagnostic précoce de la
toxoplasmose congénitale.
Lyon Médical, 1982, 248, hors série, 27-30
36. N. PYNDIAH, U. KRECH, P. PRICE, J. WILHELM
Simplified chromatographic separation of
immunoglobulin M from G and its application
to Toxoplasma indirect immunofluorescence.
J. clin. micr., 1979, 9, 2, 170-174
37. J. RAYMOND
Toxoplasme et toxoplasmose.
Associat. Anc. El. IP Paris, 1983, 97, 6-18
38. J.S. REMINGTON
A double- sandwich IgM-ELISA for diagnosis of acute
acquired and congenital toxoplasma infection.
Lyon Médical, 1982, 248, hors série, 31-35



39. J.S. REMINGTON
Detection and characterization of membrane antigens of Toxoplasma gondii.
Lyon Médical, 1982, 248, hors série, 9-13
40. R. ROBERT, J.M. SENET
Evaluation d'un test au latex sensibilisé par un antigène total pour le dépistage rapide des anticorps antitoxoplasmiques.
Feuillets de Biologie, 1984, 25, 140, 33-36
41. D. ROUGIER, AMBROISE-THOMAS P.
Detection of toxoplasmic immunity by multipuncture skin test with excretory-secretory antigen.
Lancet, 1985, 2, 121-123
42. P. SALIOU, Y. MUZELLEC, P. AMBROISE-THOMAS, M.Y. CAGNARD, M.C. BENTEJAC, D. ROUGIER, H. PIQUOT
Intérêt d'un test percutané dans la détermination de l'immunité toxoplasmique.
Lyon Médical, 1985, 253, 9/10, 261-263
43. J.P. SEQUELA
Cinétique des anticorps IgA, IgG, IgM dans la toxoplasmose.
Lyon Médical, 1982, 248, hors série, 21
44. K.K. SETHI
Monoclonal antibodies against Toxoplasma gondii.
Lyon Médical, 1982, 248, hors série, 55-58
45. S.D. SHARMA, F.G. ARAUJO, J.S. REMINGTON
Toxoplasma antigen isolated by affinity chromatography with monoclonal antibody protects mice against lethal infection with Toxoplasma gondii.
J. immunol., 1984, 133, 6, 2818-2820

46. S.D. SHARMA, J. MULLENAX, F.G. ARAUJO, H.A. ERLICH,
J.S. REMINGTON
Western blot analysis of the antigens of
Toxoplasma gondii recognized by human IgM
and IgG antibodies.
J. immunol., 1983, 131, 2, 977-983
47. R. TAYLOR, M.B. BCHIR, D. PHIL
Immunoperoxidase techniques.
Arch. Pathol. Lab. Med., 1978, 102, 113-121
48. R. TRAN MANH SUNG
Les essais de radio-vaccins dans la toxoplasmose
murine.
Lyon Médical, 1982, 248, hors série, 101-105
49. F. VAN KNAPEN
Detection and significance of circulating antigens
and complexes in toxoplasma infections.
Lyon Médical, 1982, 248, hors série, 51-54
50. F. VAN KNAPEN, S.O. PANGGABEAN, J. VAN LEUSDEN
Demonstration of Toxoplasma antigen containing
complexes in active toxoplasmosis.
J. clin. micr., 1985, 22, 4, 645-650
51. K.W. WALLS, E.L. FRANCO
Reversed enzyme immunoassay.
Lyon Médical, 1982, 248, hors série, 43-49
52. F. WIELAARD, H. VAN GRUIJTHUIJSEN, W. DUERMAYER, A. JOSS,
L. SKINNER, H. WILLIAMS, H. VAN ELVEN
Diagnosis of acute toxoplasmosis by an enzyme
immunoassay for specific immunoglobulin M antibodies.
J. clin. micr., 1983, 17, 6, 981-987
53. Notes de laboratoire
Bulletins et notes explicatives publiés par les firmes
commerciales.