Contribution à l'étude des phénomènes immunologiques dans la toxoplasmose expérimentale

II. Évolution cinétique qualitative et quantitative des constituants sériques chez la Souris C.B.A.

par **R. TAILLIEZ, F. FLOCH, A. VERNES et J. BIGUET**

(Collaboration technique : J. BOULEN, P. VANHOUTTEGHEM)

*Laboratoire de Zoologie-Parasitologie et Unité d'Immunochimie parasitaire
I.N.S.E.R.M. U-42, rue du Professeur-Laguesse, F 59000 Lille*

Résumé.

Les variations relatives des constituants sériques au cours de l'évolution de la toxoplasmose chez la Souris C B A, ont été étudiées par électrophorèse en acétate de cellulose.

La technique d'immunodiffusion radiale a été utilisée pour caractériser dans le temps les diverses classes d'immunoglobulines.

Entre le 7^e et le 21^e jour d'évolution de la maladie, on assiste à une diminution significative de l'albumine et conjointement à une augmentation significative des β -globulines.

Une augmentation continue des γ -globulines est contrebalancée par une diminution des α -globulines.

Après le 14^e jour, les immunoglobulines IgG_{2a} et IgM sont relativement augmentées ; les IgG_{2b} restent constantes jusqu'au 84^e jour alors que les IgG₁ et les IgA, après une augmentation sensible au 7^e jour, diminuent au 14^e jour pour reprendre leur valeur normale au 84^e jour.

Par ailleurs, la réinfection par une souche virulente au 14^e jour de l'infection chronique produit en 3 jours une augmentation des IgG_{2a} aussi forte que celle observée après 42 jours d'évolution de la souche chronique seule.

Summary.

Contribution to the study of immunological phenomenous in experimental toxoplasmosis. II. Cinetic qualitative and quantitative evolution of seric components in C.B.A. mouse.

The relative variations of the seric components during the course of experimental toxoplasmosis in C B A mouse were studied by cellulose acetate electrophoresis.

The radial immunodiffusion technique was used to characterize the various immunoglobulins classes at different times.

Between the 7th and the 21st day, the authors observe a significant decrease of albumin and a significant increase of β -globulins at the same time.

A continuous increase of γ -globulins is equilibrated by a decrease of the α -globulins.

After the 14th day, the IgG_{2a} and IgM are relatively increased; the IgG_{2b} remain constant up to the 84th day whereas the IgG₁ and the IgA, after a sensitive increase on the 7th day, decrease on the 14th day then return to normal value on the 84th day.

Besides, the re-infection by a virulent strain on the 14th day of the chronic experimental disease, gives an increase of the IgG_{2a} as important as the increase observed when the chronic strain ran its course alone for 42 days.

Introduction.

Dès 1929, Levatidi et coll. [6] montraient chez le lapin l'existence d'une immunité de nature humorale et tissulaire au cours de la Toxoplasmose. Depuis de nombreux travaux concluent en faveur d'une immunité à médiation cellulaire [2, 3, 4], l'intervention des facteurs sériques n'étant pas exclue pour autant des mécanismes immunitaires. En effet, l'action des anticorps est mise en évidence *in vitro* dans le « dye-test » de Sabin et Feldmann [1]; cependant, comme les toxoplasmes sont des parasites intracellulaires, les anticorps ne peuvent agir efficacement dans une infection que passagèrement, lors de la libération des toxoplasmes d'une cellule, et avant qu'ils ne pénètrent dans une nouvelle cellule.

Pour Strannegard [11, 12, 13], il semble que les anticorps sériques susceptibles d'agir sur la membrane du toxoplasme appartiennent aux classes des IgM et des IgG, les premiers agissant plus efficacement. Pour Staib, les IgM apparaissent dès le 4^e jour [10] bien avant les IgG.

Afin de préciser ces derniers travaux et compléter nos études sur l'hypersensibilité de type retardé dans la Toxoplasmose expérimentale de la souris CBA [2, 3], nous nous sommes proposés :

— d'étudier les variations qualitatives et quantitatives des constituants sériques qui avaient déjà fait l'objet des travaux de Laugier et coll. [5] et de Remington et coll. [9], mais en effectuant cette fois l'analyse statistique des résultats obtenus ;

— d'étudier la cinétique des diverses classes d'immunoglobulines au cours de la parasitose.

Matériel et méthodes.

1° Animaux.

Des séries de souris CBA de souche isogénique âgées de 4 à 5 semaines (fournies par le C.S.E.A.L.-C.N.R.S., Orléans, La Source) ont été infectées par injection intra-péritonéale de 30 kystes de toxoplasme souche 76K « chronique » entretenue sur souris Swiss [5]. Les animaux ont été sacrifiés après 7, 14, 21, 42 et 84 jours d'évolution de la maladie.

Dans une 2° expérience, des souris infectées par la souche 76K ont été réinfectées au 14^e jour par 10³ cellules de la souche RH (entretenu par passage bi-hebdomadaire sur péritoine de souris) et sacrifiées après 1, 3, 7 et 10 jours.

L'étude des constituants sériques par électrophorèse en acétate de cellulose a été réalisée par analyse individuelle des sérums.

L'étude des diverses classes d'immunoglobulines par immunodiffusion radiale a été effectuée sur des « pools » de sérums correspondant aux séries d'animaux ayant le même temps d'évolution de la parasitose.

Tous les sérums contenant de l'hémoglobine ont été éliminés.

2° Méthodes.

Les techniques d'électrophorèse et d'immunodiffusion radiale ainsi que les réactifs utilisés sont analogues à ceux précédemment employés dans nos précédents travaux [14].

L'analyse statistique a été effectuée pour les résultats obtenus après électrophorèse : pour chaque constituant sérique examiné a été pratiqué le test d'analyse de la variance permettant de voir si les moyennes observées différaient significativement dans leur ensemble. Lorsque ce test s'avérait significatif au seuil de 5 %, des comparaisons individuelles étaient alors pratiquées à l'aide de la variance résiduelle précédente par le test de Student.

Les résultats obtenus par immunodiffusion radiale sur les « pools » de sérums sont les moyennes de 3 lectures et n'ont pas été soumis à l'analyse statistique.

Résultats.

1° Souris infectées par 30 kystes de toxoplasmes de la souche 76K.

a) CONSTITUANTS SÉRIQUES.

Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau I illustré par les courbes de la fig. 1.

TABLEAU I. — *Toxoplasmose chez la Souris CBA infectée par 30 kystes de Toxoplasme souche 76 K. Variations cinétiques des pourcentages des constituants sériques après électrophorèse en acétate de cellulose. Les valeurs limites à $p = 0,05$ des moyennes sont indiquées entre parenthèses. Ne figurent dans ce tableau que les résultats des tests statistiques de comparaisons individuelles avec les témoins.*

* NS: non significatif; +: $0,01 < p < 0,05$; ++: $0,001 < p < 0,01$; +++: $p < 0,001$.

Série	Nombre d'animaux	Nombre de jours	Pourcentages			
			Albumine	α Glob.	β Glob.	γ Glob.
Témoins	17	0	55,7 (53,6-57,8)	21,1 (20,4-21,8)	13,8 (12,8-14,8)	9,1 (7,0-11,1)
A	9	7	47,1 (41,8-52,4) +++	15,1 (12,1-18,2) +++	28,2 (24,8-31,7) +++	9,8 (6,6-13,0) NS
B	10	14	45,5 (39,1-51,9) +++	13,3 (11,1-15,4) +++	28,5 (25,4-31,6) +++	12,7 (9,3-16,0) ++
C	9	21	50,7 (47,9-53,4) +	13,7 (12,4-15,0) +++	21,6 (20,7-22,5) +++	14,3 (12,6-16,2) +++
D	10	42	53,5 (48,2-58,8) NS	10,8 (9,4-12,2) +++	18,6 (16,2-21,0) +++	17,3 (14,4-20,2) ++
E	10	84	53,3 (50,5-56,1) NS*	12,4 (10,9-13,8) +++	17,5 (15,0-18,9) ++	16,9 (15,6-18,2) +++

FIG. 1.

L'analyse statistique des moyennes observées pour chaque série d'animaux après comparaisons individuelles permet de constater que :

— le pourcentage d'albumine décroît dès le 7^e jour avec un minimum les 7^e et 14^e jours, puis augmente significativement le 21^e jour pour atteindre un palier au 42^e jour le ramenant à sa valeur initiale ;

— le pourcentage d' α -globuline décroît constamment pour atteindre un palier au 42^e jour ;

— le pourcentage de β -globuline passe par un maximum du 7^e au 14^e jour, puis diminue lentement pour atteindre un palier au 42^e jour sans revenir à sa valeur initiale ;

— le pourcentage des γ -globulines subit une augmentation continue sensible au 14^e jour et atteint un palier au 21^e jour.

On constate en première approximation que l'albumine et les β -globulines varient de façon inverse (pourcentages compensés). Il en est de même pour le couple α -globulines- γ -globulines dont les variations se compensent, mais de façon moins évidente.

b) IMMUNOGLOBULINES.

Les résultats sont synthétisés dans le tableau II et la fig. 2.

Après une augmentation sensible au 7^e jour, les IgG₁ et les IgA voient leurs concentrations par rapport au témoin diminuer nettement pour revenir aux valeurs normales au 84^e jour.

Les IgG_{2a}, par contre, augmentent notablement après le 14^e jour, pour atteindre au 42^e jour des concentrations 3 fois supérieures à celles du témoin.

La concentration des IgM augmente de façon continue pour atteindre 1,7 fois la valeur du témoin entre le 42^e et le 84^e jour.

Quant aux IgG_{2b}, elles semblent peu perturbées au cours de l'intervalle de temps.

2° Souris infectées par 30 kystes de la souche 76K et réinfectées au 14^e jour par 10³ toxoplasmes de la souche RH.

a) CONSTITUANTS SÉRIQUES.

Les résultats figurent dans le tableau III et la fig. 3.

Aucune variation significative n'est observée pour l'albumine et pour les γ -globulines.

Les α -globulines n'augmentent significativement qu'au 10^e jour.

Quant aux β -globulines, elles subissent une diminution faible, mais cependant, significative dès le 1^{er} jour après la réinfection pour rester ensuite stables jusqu'au 10^e jour.

b) IMMUNOGLOBULINES.

Le tableau IV et la fig. 4 rapportent les résultats obtenus.

TABLEAU II. — *Toxoplasmose chez la Souris CBA infectée par 30 kystes de Toxoplasmes souche 76 K. Variations des Immunoglobulines : les résultats des dosages effectués par immunodiffusion radiale sur des pools de sérums sont donnés en % par rapport aux témoins non infectés*

Série	Nombre d'animaux	Nombre de jours	Pourcentage par rapport au témoin				
			IgG ₁	IgG _{2a}	IgA	IgM	IgG _{2b}
Témoins	17	0	100	100	100	100	100
A	9	7	155	87	98	181	113
B	10	14	85	97	87	46	129
C	9	21	83	161	104	53	120
D	10	42	64	305	125	80	164
E	10	84	87	289	90	118	172

FIG. 2.

TABLEAU III. — *Toxoplasmose chez la Souris CBA infectée par 30 kystes de Toxoplasmes souche 76 K et réinfectée au 14^e jour par 10³ Toxoplasmes souche RH. Variations cinétiques des pourcentages des constituants sériques après électrophorèse en acétate de cellulose. Les valeurs limites à $p = 0,05$ des moyennes sont indiquées entre parenthèses. Ne figurent dans ce tableau que les résultats des tests statistiques de comparaisons individuelles avec les témoins*

* NS: non significatif; +: $0,01 < p < 0,05$; ++: $0,001 < p < 0,01$; +++: $p < 0,001$.

Série	Nombre d'animaux	Nombre de jours après la réinfection	Pourcentages			
			Albumine	α Glob.	β Glob.	γ Glob.
B (témoins)	10	0	45,5 (39,1-51,9)	13,3 (11,1-15,4)	28,5 (25,4-31,6)	12,7 (9,3-16,1)
F	5	1	50,7 (48,0-53,4) NS	12,9 (9,9-15,9) NS	22,0 (19,3-27,4) ++	14,4 (12,1-16,7) NS
G	5	3	49,1 (45,5-52,7) NS	10,5 (9,0-12,0) NS	24,0 (20,0-28,0) +	16,3 (12,1-20,5) NS
H	5	7	47,2 (43,5-50,9) NS	16,2 (13,3-19,2) NS	21,0 (16,2-25,8) ++	15,6 (12,5-18,7) NS
I	5	10	42,4 (33,9-50,9) NS*	17,8 (12,7-22,9) ++	23,2 (17,7-28,7) ++	16,5 (14,5-18,5) NS

TABLEAU IV. — *Toxoplasmose chez la Souris CBA infectée par 30 kystes de Toxoplasmes souche 76 K et réinfectée au 14^e jour par 10³ Toxoplasmes souche RH. Variations des Ig: Les résultats des dosages effectués par immunodiffusion radiale sur des « pools » de sérums sont donnés en % par rapport aux témoins non infectés*

Série	Nombre d'animaux	Nombre de jours après la réinfection	Pourcentage par rapport au témoin				
			IgG ₁	IgG _{2a}	IgG _{2b}	IgA	IgM
B (témoins)	10	0	85	97	87	46	129
F	5	1	50	182	119	63	95
G	5	3	44	311	148	70	135
H	5	7	42	197	112	80	120
I	5	10	47	221	129	82	133

FIG. 4.

Les modifications les plus importantes concernent les IgG_{2a} et les IgG_{2b} , dont les évolutions sont parallèles. Trois jours après la réinfestation la concentration des IgG_{2a} est multipliée par 3, résultat qui n'est obtenu chez les animaux non réinfectés qu'au 42^e jour. Les IgG_{2b} forment comme les précédentes un pic au 3^e jour, mais il est beaucoup moins élevé.

Quant aux autres immunoglobulines, leurs taux semblent peu modifiés comparativement aux taux observés après un même laps de temps (10 jours) chez les animaux non réinfectés.

Commentaires et Conclusions.

Pour l'essentiel, notre étude cinétique des fractions sériques par l'électrophorèse concorde avec les travaux de Laugier et coll. [5], effectués avec la même souche de toxoplasme avirulente 76K.

L'analyse statistique nous a cependant permis de préciser les variations sériques, particulièrement dans les 21 premiers jours de l'évolution de la maladie expérimentale, où nous avons pratiqué un plus grand nombre d'examen parce que c'est durant ces premières semaines que les réactions d'hypersensibilité de type retardé sont à leur maximum [3].

Nos résultats, par contre, diffèrent partiellement de ceux qui ont été publiés par Remington et coll. [9] ; suivant ces auteurs, et contrairement à nos observations, les α -globulines augmentent entre le 4^e et le 14^e jour, tandis que les γ -globulines diminuent légèrement aux 7^e et 9^e jours.

Ces divergences tiennent peut-être au fait que Remington et coll. utilisent une technique d'analyse (électrophorèse sur papier), des souris (souche Swiss Webster) et des souches de toxoplasmes avirulentes (H 44 et M 7741), différentes des nôtres. De plus, la critique statistique de leurs résultats n'a pas été faite.

L'évolution des immunoglobulines dans la toxoplasmose expérimentale des souris mérite d'être comparée à celle de l'hypersensibilité de type retardé (H.S.R.) appréciée par le test *in vitro* de l'inhibition de l'étalement des macrophages que nous avons effectué sur les mêmes lots de souris [3].

Le maximum de l'H.S.R. qui reflète sans doute l'immunité cellulaire a été observé le 14^e jour : il coïncide avec une chute marquée des IgG_1 et des IgA ; mais il est suivi d'une très nette augmentation des IgG_{2a} qui est particulièrement rapide lors d'une réinfection. La chute brutale des IgG_1 et des IgA entre le 7^e et le 14^e jour s'explique peut-être par leur mobilisation au cours de la phase de multiplication des toxoplasmes dans les cellules péritonéales, phase qui atteint son apogée aux environs du 10^e jour. Il est possible que les IgA interviennent pour limiter cette culture intra-péritonéale. L'hypothèse que les IgG_1 jouent au contraire un rôle fugace d'anticorps facilitants et limitent la montée de l'H.S.R. est plus hasardeuse et reste à vérifier.

Par contre, le taux élevé des IgG_{2a} dont le pouvoir lytique a été démontré *in vitro* [8] contrôle vraisemblablement *pro parte* le nombre et le devenir des kystes intracérébraux en limitant, d'une part, la multiplication des toxoplasmes qui attei-

gnent le cerveau et en évitant, d'autre part, un réveil et une dissémination de l'infection à partir des toxoplasmes contenus dans les kystes.

L'ascension brutale des mêmes immunoglobulines lors de la réinfestation de souris par une souche virulente RH après qu'elles aient été parasitées 14 jours auparavant par l'injection intra-péritonéale de kystes de la souche avirulente 76K explique sans doute, à côté des mécanismes cellulaires et sans qu'il soit actuellement possible de faire la part exacte des uns et des autres, la survie prolongée des animaux prémunis par rapport aux animaux témoins [3].

Bibliographie

1. FELDMAN (H. A.), 1956. — The relationship of *Toxoplasma* antibody activator to the serum-properdin system. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 66, 263-267.
2. FLOC'H (F.), VERNES (A.) et BIGUET (J.), 1972. — Contribution à l'étude des phénomènes immunologiques dans la toxoplasmose expérimentale. I. Etude *in vivo* chez la Souris Balb/C. *Ann. Parasit. hum. comp.*, 47, 667-679.
3. —, 1973. — Rôle de l'hypersensibilité retardée et de l'immunité cellulaire dans la toxoplasmose expérimentale. *Thèse de 3^e cycle* (Lille).
4. FRENKEL (J. K.), 1967. — Adoptive immunity to intracellular infection. *J. Immunol.*, 98, 1309-1319.
5. LAUGIER (M.) et QUILICI (M.), 1970. — Intérêt expérimental d'une souche de toxoplasme peu pathogène pour la Souris. *Ann. Parasit. hum. comp.*, 45, 389-403.
6. LÉVATIDI (C.), SANCHIS-BAYARRI (V.), LÉPINE (P.) et SCHOEN (R.), 1929. — Etude sur l'encéphalo-myélite provoquée par le *Toxoplasma cuniculi*. *Ann. Inst. Pasteur*, 43, 1063.
7. NAKAYAMA (I.), 1964. — Persistence of the virulence RH strain of *Toxoplasma gondii* in the brains of immune mice. *Keio. J. Med.*, Tokyo, 13, 7-12.
8. OVARY (Z.), BARTH (W. F.) et FAHEY (J. L.), 1965. — The immunoglobulins of mice. III. Skin sensitizing activity of mouse immunoglobulins. *J. Immunol.*, 94, 410.
9. REMINGTON (J. S.) et HACKMAN (R.), 1966. — Changes in mouse serum proteins during acute and chronic infection with an intracellular parasite (*Toxoplasma gondii*). *J. Immunol.*, 95, 1023-1033.
10. STAIB (F.), SEELIGER (H. P. R.) et CURA (J.), 1966. — Preliminary investigations on the formation of antibodies sensitive and resistant to 2 Mercaptoethanol in experimental toxoplasmosis. *Ztschr. Med. Mikrob. Immunol.*, 153, 20-30.
11. STRANNEGARD (Ö.), 1967. — The formation of *Toxoplasma* antibodies in rabbits. *Acta path. microbiol. scand.*, 71, 439.
12. —, 1967. — Kinetics of *in vitro* immuno-inactivation of *Toxoplasma*. *Acta path. microbiol. scand.*, 71, 450.
13. —, 1967. — An electron microscopy study on immuno-inactivation. *Acta path. microbiol. scand.*, 71, 463.
14. VERNES (A.), TAILLIEZ (R.), FLOC'H (F.) et BIGUET (J.), 1973. — Trichinose expérimentale. II. Variations quantitatives et qualitatives des globulines sériques chez la Souris CBA et le Rat Wistar. *Int. J. Parasit.* (à paraître).