AUGMENTATION DE LA RÉSISTANCE DES SOURIS A *TOXOPLASMA GONDII* PAR DEUX POLYSACCHARIDES β 1-3, β 1-6 (LE PSAT ET LE SCLÉROGLUCANE)

M. BOUSQUET*, L. ESCOULA*, B. PIPY**, M. H. BESSIÈRES***,
L. CHAVANT****, J. P. SEQUELA***

RÉSUMÉ. L'influence de deux polysaccharides, le PSAT et le Scléroglycane a été évaluée sur la résistance des souris infectées avec différentes souches de *Toxoplasma gondii* (souche RH, souche RH « atténuée », souche kystogène Prugniald).

Seul le PSAT (1 mg/kg), injecté par voie intraveineuse (IV) ou intramusculaire (IM), augmente la résistance des souris infectées par la souche RH atténuée : 100 % de survivants contre 33 % dans le lot des souris non traitées et 50 % dans le lot traité avec le Scléroglycane (10 mg/kg) par voie IV. Par contre, le PSAT n'exerce aucun effet protecteur vis-à-vis de la souche RH virulente : toutes les souris meurent entre le 7^e et le 8^e jour.

A la suite d'une infection par 15 kystes de la souche Prugniald, nous avons montré que le PSAT (1 mg/kg) et le Scléroglycane (10 mg/kg) injectés par voie IM diminuent la chimiluminescence des macrophages péritonéaux et le nombre de kystes intracérébraux chez la souris.

Mots-clés : Résistance à *Toxoplasma gondii*. Polysaccharides β 1-3, β 1-6. PSAT. Scléroglycane.

Two β 1-3, β 1-6 polysaccharides (PSAT et Scleroglucan) induce enhancement of the resistance of mice to *Toxoplasma gondii*.

SUMMARY. The protective effect of PSAT and Scleroglucan (β 1-3, β 1-6 polysaccharides), has been studied in mice infected with different strains of *Toxoplasma gondii* (RH, attenuated RH or Prugniald strains).

Intramuscular or intravenous administration of PSAT before infection of mice by the attenuated RH strain, resulted in a significant enhancement of survival: 100 % of survival in the treated group, compared to 33 % in controls and 50 % in mice pretreated with Scleroglucan (10 mg/kg, intravenously).

In contrast, there was no difference in the survival rate between the group treated with PSAT (1 mg/kg, IV) and the control in mice infected with the virulent RH strain: all mice died between day 7 and day 8.

In mice infected with 15 cysts of the Prugniald strain a decrease in the chemiluminescence (CL) of peritoneal macrophages and of the number of cysts in the brain of mice were observed in mice treated either with PSAT (1 mg/kg, IM) or scleroglucan (10 mg/kg, IM).

Key-words : Resistance to *Toxoplasma gondii*. Polysaccharide β 1-3, β 1-6. PSAT. Scleroglucan.

* Station de Pharmacologie-Toxicologie, INRA, 180, chemin de Tournefeuille, F 31300 Toulouse.

** INSERM U87, Toulouse.

*** Service Parasitologie-Mycologie, CHU Rangueil, Toulouse.

**** Laboratoire de Cryptogamie, Université Paul-Sabatier, Toulouse.

Accepté le 22 février 1988.

Introduction

Plusieurs polysaccharides (Lentinan, Glucan...) de nature glycosidique et de structure $\beta(1-3)$ et $\beta(1-6)$ exercent un effet protecteur chez les animaux vis-à-vis d'infections bactériennes (Di Luzio, Williams, 1979 ; Reynolds, Castello, Harrington Crabbs, Peters, Jemski, Scott, Di Luzio, 1980 ; Lahnborg, Hedstrom, Nord, 1982 ; Sakamoto, Ishii, Nishioka, 1983 ; David, Williams, Browder, Di Luzio, 1982), virales (Williams, Di Luzio, 1980 ; Gendrault, Gut, Schmitt, Kirn, Di Luzio, 1986) et parasitaires (Byrum, Sher, Di Pietro, Von Lichtenberg, 1979 ; Holbrook, Cook, Parker, 1981 ; Cook, Runey, Holbrook, 1983). Leurs propriétés immunopharmacologiques sont partiellement caractérisées ; ce sont des immunopotentialisateurs de l'activité des lymphocytes T et des macrophages (Chihara, 1984 ; Di Luzio, 1985). Compte tenu de leur mode d'action présumé, il nous a paru intéressant d'étudier l'incidence de deux d'entre eux sur la résistance des souris infectées par *T. gondii*. Ce parasite intracellulaire entraîne une altération des fonctions des lymphocytes T et des macrophages (Strickland, Pettitt, Voller, 1973 ; Wing, Boehmer, Christner, 1983) chez les animaux infectés.

Les deux polysaccharides étudiés sont le Scléroglycane, connu pour ses propriétés immunomodulatrices (Singh et Whistler, 1974) et le PSAT, récemment produit à partir d'un champignon de la classe des Deuteromycetes. Les infections expérimentales ont été réalisées avec une souche RH virulente, une souche RH atténuée et une souche kystogène (Prugniaud). Dans le cas de l'infection avec la souche Prugniaud, nous avons envisagé l'incidence de ces deux polysaccharides sur l'activation des macrophages vis-à-vis de la souche RH atténuée et précisé l'action des deux polysaccharides sur l'activation des macrophages.

Matériel et méthodes

SOURIS

Des souris Swiss femelles (IFFA CREDO) de 8 à 10 semaines sont utilisées pour ces études. Les animaux sont randomisés dans des cages plastiques par lots de 6 ou 12 ; l'eau et la nourriture leur sont données *ad libitum*.

SOUCHES DE *Toxoplasma gondii* UTILISÉES

— Souche RH.

Les tachyzoïtes de la souche RH de *Toxoplasma gondii* sont recueillis dans du milieu 199 (Bioproducts France) selon la méthode de Stadsbaeder, Nguyen et Calvin-Preval (1975) par lavage de la cavité péritonéale d'une souris préalablement infectée 3 jours auparavant.

— *Souche RH « atténuée ».*

Elle a été obtenue par congélation à -80°C pendant 3 mois des tachyzoïtes de la souche RH en présence de DMSO (10 %). Après décongélation à 37°C , l'inoculation intrapéritonéale de 1×10^4 tachyzoïtes de cette souche entraîne un taux de mortalité de l'ordre de 65 % au 12^e jour de l'infection, alors qu'il est de 100 % entre le 6^e et le 9^e jour avec les tachyzoïtes de la souche RH.

— *Souche kystogène Prugniaud.*

Elle a été isolée en 1966 d'un enfant atteint de toxoplasmose congénitale dans le service de Parasitologie du Centre Hospitalier Universitaire de Limoges (Pr A. Pestre). Les kystes ont été préparés selon la méthode de Jacob et Remington (1960).

POLYSACCHARIDES

Le polysaccharide PSAT a été produit par un champignon de la classe des Deuteromycetes, provenant de la mycothèque du laboratoire de Cryptogamie de l'Université Paul Sabatier (Toulouse, France). L'exopolysaccharide est récupéré selon la technique préalablement décrite par Bousquet, Raynaud, Escoula, Chavant (1986). L'étude structurale a révélé qu'il s'agissait d'un polysaccharide, formé de l'enchaînement de molécules de glucose unies par des liaisons glycosidiques $\beta 1-3$ et des ramifications $\beta 1-6$. Dans le cadre de notre étude le polysaccharide PSAT est dissous dans le sérum physiologique stérile, à la concentration de 1 mg/ml et stérilisé 15 minutes à 100°C (bain-marie). Le Scléroglycane est un polysaccharide également de structure glycosidique $\beta 1-3$, $\beta 1-6$ (Singh, Whistler, 1974). Il nous a été gracieusement fourni par la Société Mero-Rousselot-Satia (Paris, France). Comme pour le PSAT, il est dissous dans du sérum physiologique et stérilisé.

— *Traitement.*

Les souris ont été prétraitées à J-7, J-4, J-1 avec le PSAT (1 mg/kg/jour) ou le Scléroglycane (10 mg/kg/jour). L'infection a été réalisée (J0) par voie intrapéritonéale (IP), soit avec 10^8 tachyzoïtes de la souche RH, 10^4 tachyzoïtes de la souche RH « atténuée », ou soit avec 15 kystes de la souche Prugniaud. Lors de l'infection avec la souche RH, le PSAT a été également administré (IV) en post-traitement (de J+1 à J+5).

Le PSAT a été testé en pré-traitement par les voies intraveineuse (IV), intramusculaire (IM) ou sous-cutanée (SC) dans le cas de l'infection avec la souche RH atténuée ; par la voie IV en pré- ou post-traitement, lors de l'infection avec la souche RH et par la voie IM lorsque les souris sont infectées avec la souche Prugniaud. Pour le Scléroglycane, les voies d'administration ont été IV et SC avec la souche RH atténuée et IM avec la souche kystogène Prugniaud.

ÉTUDE DE L'ACTIVITÉ DES POLYSACCHARIDES SUR LA RÉSISTANCE DES SOURIS INFECTÉES PAR DIFFÉRENTES SOUCHES DE TOXOPLASME

Elle a été réalisée sur des lots de 12 souris. Les animaux ont fait l'objet d'un suivi en ce qui concerne la croissance pondérale et le taux de mortalité sur une période de 30 à 60 jours selon la souche de Toxoplasme utilisée ; les souris de chaque lot étaient pesées tous les 2 jours.

ÉTUDE DE L'ACTIVITÉ DES 2 POLYSACCHARIDES SUR L'ACTIVATION DES MACROPHAGES, SUR LA RÉPONSE HUMORALE ET LE NOMBRE DE KYSTES INTRACÉRÉBRAUX

a) *Numération des kystes intracérébraux.*

Les cerveaux sont prélevés et broyés dans 2 ml de sérum physiologique. Après homogénéisation, le nombre de kystes est déterminé en microscopie optique (grossissement 10×10), à partir de 20 μ l déposés entre lame et lamelle. Cinq déterminations sont réalisées par animal.

b) *Mesure de la chimiluminescence (CL) des macrophages péritonéaux.*

Les cellules péritonéales sont recueillies par lavage de la cavité péritonéale avec 5 ml de milieu 199 (Bioproduct), supplémenté avec des sels de Hanks, 20 UI/ml d'héparine, 100 μ g/ml de streptomycine, 100 UI/ml de pénicilline G et 5 % de sérum de veau fœtal (SVF, Bioproduct, France).

Après centrifugation à 400 g pendant 8 minutes, le culot cellulaire est remis en suspension dans du DMEM (Bioproduct) complémenté avec 100 μ g/ml de streptomycine, 100 UI/ml de pénicilline G et 1 % de SVF. Le nombre de cellules retenu est de $4 \cdot 10^6$ cellules/ml (40 à 50 % de ces cellules sont des macrophages).

Les mesures de CL sont réalisées suivant le protocole défini par De Marrousem, Pipy, Béraud, Souqual, Forgue (1986) ; 200 μ l de macrophages sont mélangés dans un tube déposé dans un luminomètre LKB 1251 thermostaté à 37° C, à 100 μ l de luminol (concentration finale 66 μ M) et à 100 μ l de milieu 199.

Pour activer les macrophages, on rajoute dans chaque tube 100 μ l de zymosan opsonisé par du sérum de lapin (concentration finale : 0,17 mg/ml). La CL induite par les macrophages est enregistrée en millivolts (mV) sur l'imprimante d'un ordinateur Hewlett Pakard HP85.

c) *Détermination du taux sérique des IgG, du C3, de l'albumine et des anticorps spécifiques.*

Le dosage de l'albumine, des IgG, de la fraction C3 du complément est réalisé par néphélémétrie laser (Behring) en utilisant des antisérums spécifiques (Cappel, Worthington). Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport à un sérum de référence (Miles). Le titre en anticorps spécifiques est déterminé par immunofluorescence indirecte (Ambroise-Thomas, 1969) à l'aide d'antiglobuline de souris (Pasteur Production).

Analyses statistiques : Le test du χ^2 a été retenu pour étudier les différences entre les taux de mortalité des animaux traités et non traités. Les autres résultats ont été analysés par le test de Dunnett.

Résultats

1. INFLUENCE DES POLYSACCHARIDES SUR LA RÉSISTANCE DES SOURIS INFECTÉES PAR DIFFÉRENTES SOUCHES DE TOXOPLASME

— Souche RH « atténuée ».

L'inoculation, par voie IP de 10^4 tachyzoïtes de la souche RH « atténuée », entraîne un taux de mortalité de 67 % dès le 12^e jour de l'infection dans le lot de souris non traitées avec les polysaccharides (*tableau I*). L'injection du PSAT (1 mg/kg/jour) par les voies IV ou IM à J-7, J-4, J-1, avant l'infection par 10^4 tachyzoïtes de la souche RH atténuée à J0 entraîne un taux de survivants de 100 % à J+30.

Dans les mêmes conditions expérimentales, le Scléroglycane ne permet qu'un taux de survie de 50 % à J+30. Lorsque le PSAT et le Scléroglycane sont injectés par voie SC, les taux de survie diminuent : ils sont, respectivement de 83 % et 42 % à J+30. La mort des animaux survient entre le 10^e et le 12^e jour et elle est précédée d'une chute de poids de l'ordre de 10 %.

Aux doses retenues, l'administration seule des polysaccharides n'entraîne ni mortalité, ni chute de poids.

— Souche RH virulente.

Quel que soit le protocole d'administration retenu (J-7, J-4, J-1 ou J+1 à J+5), le PSAT (1 mg/kg/jour), injecté par voie IV ne protège pas les souris infectées par voie IP avec 10^8 tachyzoïtes de la souche RH (0 % de survivants) (*tableau I*). La mort des animaux survient avant le huitième jour de l'infection, quel que soit le lot considéré ; elle est précédée d'une chute de poids de 25 % environ.

— Souche Prugnialud.

Sur une période de soixante jours après l'infection, nous n'avons pas observé de mortalité chez les souris inoculées (IP) avec 15 kystes de la souche Prugnialud.

Sur la même période d'observation, l'administration IM du PSAT (1 mg/kg/jour) et du Scléroglycane (10 mg/kg/jour), 7, 4 et 1 jour avant l'infection n'entraîne également aucune mortalité.

TABLEAU I. — Influence du PSAT et du Scléroglycane sur la résistance des souris infectées avec la souche RH atténuée ou la souche RH de *T. gondii*.

Traitement		<i>T. gondii</i> Infection (IP)	Nombre de survivants								
Poly- saccharide	Voie d'adminis- tration		J0	J6	J7	J8	J9	J10	J11	J12	J30
Sérum physio- logique*	IV	— RH _a	12 12	— —	— —	— —	— —	— —	— 7	— 4	12 4
Scléroglycane*	SC	RH _a	12	—	—	—	—	—	8	5	5
Scléroglycane*	IV	RH _a	12	—	—	—	—	—	8	6	6
PSAT*	SC	RH _a	12	—	—	—	—	10	10	10	10***
PSAT*	IM	RH _a	12	—	—	—	—	—	—	—	12***
PSAT*	IV	RH _a	12	—	—	—	—	—	—	—	12***
—	—	RH _{vi}	12	—	8	0					0
PSAT*	IM	RH _{vi}	12	—	6	0					0
PSAT**	IM	RH _{vi}	12	—	7	0					0

* PSAT (1 mg/kg/jour) ou le Scléroglycane (10 mg/kg/jour) à J-7, J-4, J-1.

** PSAT (1 mg/kg/jour) de J+1 à J+5.

Infection à J0 par 10⁴ tachyzoïtes de la souche RH atténuée (RH_a) ou 10³ tachyzoïtes de la souche RH (RH_{vi}).

*** Taux de survivants significativement différent du taux observé chez les animaux infectés et traités ou non par le Scléroglycane ($P < 0,05$, test du χ^2).

2. ÉTUDE DE L'ACTIVITÉ DES DEUX POLYSACCHARIDES CHEZ LES SOURIS INFECTÉES PAR LA SOUCHE PRUGNIAUD

— Numération des kystes intracérébraux.

Au quinzième jour de l'infection, nous n'avons pas détecté de kystes dans le cerveau des souris. Par contre, au trentième jour, on dénombre en moyenne 380 ± 62 kystes dans le cerveau des souris non traitées, 260 ± 85 et 150 ± 41 kystes dans le cerveau des souris traitées respectivement avec le PSAT ou le Scléroglycane (*fig. 1*).

Soixante jours après l'infection ces valeurs sont de 861 ± 290 kystes (souris infectées non traitées) et de 420 ± 30 et 506 ± 41 kystes après traitement avec le PSAT ou le Scléroglycane.

FIG. 1. — Influence du PSAT (1 mg/kg/jour) (▨), du Scléroglycane (10 mg/kg/jour) (▤), administrés par voie IM à J-7, J-4, J-1 sur le nombre de kystes intracérébraux des souris infectées (IP) à J0 avec 15 kystes de la souche Prugniald (□ : souris infectées non traitées). * Nombre de kystes significativement différent ($P < 0,05$) par rapport au lot des souris infectées, non traitées (test de Dunnett).

— Chimiluminescence des macrophages péritonéaux.

Quinze jours après l'infection, nous avons constaté (*fig. 2*) une très forte augmentation de la CL (80 mV) des macrophages péritonéaux (stimulés avec du zymosan opsonisé) alors que la CL des macrophages des souris non infectées est de 4 mV. La CL décroît au 30^e et 60^e jour après l'infection, mais elle demeure toujours supérieure à la CL des macrophages des souris non infectées. La *figure 2* montre que

la CL des macrophages des animaux traités avec le PSAT est toujours inférieure (de l'ordre de 50 %) à la CL des macrophages des animaux seulement infectés. Avec le Scléroglycane, la diminution n'est significative qu'au 15^e jour de l'infection.

FIG. 2. — Influence du PSAT (1 mg/kg/jour) ▤, du Scléroglycane (10 mg/kg/jour) ▦, administrés par voie IM à J-7, J-4, J-1 sur la CL des macrophages péritonéaux (stimulés avec du zymosan opsonisé), des souris infectées (IP) à J0 avec 15 kystes de la souche Prugnialud (□ : souris infectées, non traitées ; ▨ : souris témoins).

* CL significativement différente ($P < 0,05$) par rapport à la CL des macrophages des souris infectées, non traitées (test de Dunnett).

— Taux sériques des IgG, du C3 et de l'albumine.

A J+15, le titre des anticorps spécifiques chez les animaux traités avec le PSAT, est significativement inférieur ($P < 0,05$) à celui déterminé chez les animaux non traités (fig. 3). Cette diminution n'est pas retrouvée avec le Scléroglycane ni avec le PSAT à J+30 et J+60.

Le taux des IgG sériques est de même inférieur à J+15 chez les animaux pré-traités par le PSAT (tableau II). Les polysaccharides ne modifient pas significativement le taux du C3 et de l'albumine chez les animaux infectés.

Discussion

Le polysaccharide PSAT, administré par voie IV ou IM augmente la résistance des animaux infectés expérimentalement avec les tachyzoïtes de la souche RH atténuée de *T. gondii* (100 % de survivants contre 33 % dans le lot infecté non traité). Dans les mêmes conditions d'administration, le Scléroglycane procure une

FIG. 3. — Influence du PSAT (1 mg/kg/jour) ▨, du Scléroglycane (10 mg/kg/jour) ▤ sur le titre des anticorps spécifiques sériques chez les souris infectées IP, à J0 avec 15 kystes de la souche Prugniaud (□ : souris infectées, non traitées).

* Titre significativement différent ($P < 0,05$) du titre observé chez les souris non traitées (test de Dunnett).

moins bonne protection (50 % de survivants seulement). Avec la souche RH le PSAT n'a aucun effet protecteur. Ces résultats sont en accord avec les résultats de Nguyen et Stadsboeder (1977) qui ont montré que le β Glucan de Di Luzio ne protège pas les souris infectées par la souche RH. Cependant, de nombreux auteurs ont observé que le Glucan de Di Luzio augmentait la résistance des animaux infectés avec d'autres parasites intracellulaires tels que *Plasmodium berghei* (Holbrook, Cook, Parker, 1981), *Babesia microti* (Benach, Habicht, Holbrook, Cook, 1982), *Leishmania donovani* (Cook, Runey, Holbrook, 1983). Ces différents auteurs suggèrent que les $\beta(1-3)$ Glucans stimulent les défenses non spécifiques et/ou potentialisent les défenses spécifiques dirigées contre ces parasites : activation des macrophages par les lymphocytes T immuns.

L'effet protecteur que nous avons obtenu avec la souche RH atténuée ne peut pas s'expliquer par une action antiparasitaire du PSAT. En effet, la multiplication et la virulence de *T. gondii* dans des cultures cellulaires MRC5, ne sont pas modifiées en présence de 2 à 20 $\mu\text{g/ml}$ de PSAT (résultats non publiés).

Avec la souche kystogène Prugniaud, l'augmentation de CL, observée au 15^e jour est suivie d'une diminution progressive au 30^e et 60^e jour de l'infection.

Des résultats similaires ont été obtenus par Saito, Tomioka, Yamada, Jidoi (1986) à la suite d'une infection des souris par *Mycobacterium intracellulare* ou *Listeria monocytogenes* ; ces auteurs n'ont pu établir une relation entre une

TABLEAU II. — Influence du PSAT et du Scléroglycane sur l'évolution des taux sériques des IgG, du C₃ et de l'albumine.

Traitement	Infection	Évolution des taux (IgG, C ₃ , albumine) sériques chez les souris								
		IgG			C ₃			Albumine		
		J15	J30	J60	J15	J30	J60	J15	J30	J60
—	—	53 ± 12	62,9 ± 5	66,3 ± 5	111,6 ± 11	124 ± 20	ND	70,6 ± 3	71,3 ± 4	ND
—	+	87 ± 18*	174 ± 35*	188 ± 20*	120 ± 6	141 ± 20	ND	74,5 ± 3	72,1 ± 5	ND
PSAT	+	64 ± 6	158 ± 26*	163 ± 14*	110 ± 13	118 ± 10	ND	73,3 ± 2	70,1 ± 2	ND
Scléroglycane	+	91,8 ± 16*	156 ± 28*	223 ± 50*	122 ± 10	123 ± 20	ND	74 ± 2	73 ± 3	ND

Traitement : PSAT (1 mg/kg/jour) par voie IM, à J-7, J-4, J-1 ; Scléroglycane (10 mg/kg/jour) par voie IM, à J-7, J-4, J-1.

Infection : 15 kystes de la souche Prugniald par souris (IP) à J0.

* Taux significativement différent ($P < 0,05$) par rapport au taux retrouvé chez les souris non infectées (test de Dunnett).

diminution de la CL et une élimination progressive des bactéries dans l'organisme. La plus faible intensité de la CL des macrophages péritonéaux des souris, pré-traitées avec les polysaccharides peut être corrélée avec un nombre inférieur des kystes intracérébraux. Il est possible que la diminution de la CL dans ce cas soit à rapprocher d'une meilleure élimination du parasite chez les animaux traités. De nombreux auteurs ont montré que l'élimination de ce parasite était due en partie à l'action microbicide des macrophages, armés par les lymphocytes T immuns (Anderson, Remington, 1974 ; Stadtsbaeder, Nguyen, Calvin-Preval, 1975 ; Shirahata, Shimizu, Suzuki, 1975 ; Borges, Johnson, 1976 ; Lindberg, Frenkel, 1977).

Bien que nous n'ayons pas étudié l'influence de nos polysaccharides sur ces mécanismes, des résultats récents (non publiés) montre que le PSAT augmente *in vitro* la fusion phagosome-lysosomes des tachyzoïtes de la souche RH virulente dans les macrophages isolés de souris témoins ou immunisées par la souche Prugnau.

Il est à noter également une légère augmentation à J+30 et J+60 du titre des anticorps spécifiques et des IgG sans que nous puissions en préciser la signification.

L'augmentation de la résistance des souris à *Toxoplasma gondii* et en particulier la diminution du nombre de kystes intracérébraux justifieraient une étude plus approfondie des propriétés immunomodulatrices du PSAT sur l'activation des macrophages et des lymphocytes T. Son action mériterait d'être envisagée dans d'autres situations pathologiques relevant de mécanismes immuno-suppresseurs.

REMERCIEMENTS. — Les auteurs remercient Mme N. Dubech pour son assistance technique et Mme C. Santamaria pour la dactylographie de ce manuscrit.

BIBLIOGRAPHIE

- AMBROISE-THOMAS P. : Étude séro-immunologique de dix parasitoses par immunofluorescence. *Thèse es sciences*, Lyon, 1969, n° 645.
- ANDERSON J., REMINGTON J. S. : Effects of normal and activated human macrophages on *Toxoplasma gondii*. *J. Exp. Med.*, 1974, *139*, 1154-1174.
- BENACH J. L., HABICHT G. S., HOLBROOK T. W., COOK J. A. : Glucan as an adjuvant for murine *Babesia microti* immunisation trial. *Infect. Immun.*, 1982, *35*, 947-951.
- BORGES J. S., JOHNTSON W. D. J. : Inhibition of multiplication of *Toxoplasma gondii* by human monocytes exposed to T lymphocyte products. *J. Exp. Med.*, 1975, *141*, 483-496.
- BOUSQUET M., RAYNAUD J. P., ESCOULA L., CHAVANT L. : Influence de l'administration d'exopolysaccharides élaborés par des champignons filamenteux sur la résistance des souris à *Toxoplasma gondii*. Compte rendu du premier congrès international « Plantes et substances naturelles d'intérêt thérapeutiques », Monastir (Tunisie), 7-9 mai 1986.
- BYRUM J. E., SHER A., DI PIETRO J., VON LICHTENBERG F. : Potentiation of *Schistosoma granulosoma* formation by Lentinan, a T cell adjuvant. *Am. J. Path.*, 1979, *94*, 201-218.
- CHIHARA G. : Immunopharmacology of Lentinan and the glucans. *EOS Riv. Immunol. Immunopharmacol.*, 1984, *4*, 85-96.
- COOK J. A., RUNEY G. L., HOLBROOK T. W. : Immunomodulation of protozoan diseases. *Surv. Immunol. Res.*, 1983, *2*, 243-245.
- DAVID L., WILLIAMS D. S., BROWDER W., DI LUZIO N. R. : Immunotherapeutic modification of *Escherichia coli* induced experimental peritonitis and bacteremia by Glucan. *Surgery*, 1982, *93*, 448-454.

- DE MARROUSEM D., PIPY B., BERAUD M., SGUQUAL M. C., FORGUE M. F. : The effect of carbaryl on the arachidonic acid metabolism and superoxyde production by mouse peritoneal macrophages challenged by zymosan. *Int. J. Immunopharmacol.*, 1986, 8, 155-166.
- DILUZIO N. R., WILLIAMS D. L. : Glucan induced modification of the increased susceptibility of cyclophosphamide treated mice to *Staphylococcus aureus* infection. *Cancer Immunol. Immunother.*, 1979, 6, 73-79.
- DILUZIO N. R. : Uptake on the immunomodulating activities of glucans. *Springer Semin. Immunopathol.*, 1985, 8, 387-400.
- HOLBROOK T. W., COOK J. A., PARKER B. W. : Glucan enhanced immunogenicity of killed erythrocytes stages of *Plasmodium berghei*. *Infect. Immun.*, 1981, 32, 542-546.
- GENDRAULT J. L., GUT J. P., SCHMITT S., KIRN A., DILUZIO N. R. : Glucan treatment of frog virus 3 infected mice. A model for liver sinusoid regeneration. Kirn A., Knook D. L., Wisse E. (eds.). *Kupper Cell Foundation. Cell of the hepatic sinusoid*, 1986, vol. 1, 357-362.
- JACOBS L., REMINGTON J. S. : The resistance of the encysted form of *Toxoplasma gondii*. *J. Parasitol.*, 1960, 46, 11-21.
- LAHNBORG G., HEDSTRON K. G., NORD C. E. : The effect of glucan—a host resistance activator—and ampicillin on experimental intrabdominal sepsis. *J. Reticuloendothel. Soc.*, 1982, 32, 347-353.
- LINDBERG R. E., FRENKEL J. K. : Cellular immunity to *Toxoplasma* and *Besnoitia* in hamsters, specificity and the effects of cortisol. *Infect. Immun.*, 1977, 15, 855-862.
- NGUYEN B. T., STADTSBAEDER S. : Effects of β 1-3 Glucan upon infection by *Toxoplasma gondii* RH. Studies *in vivo* and *in vitro*. *Arch. Int. Physiol. Biochem.*, 1977, 86, 207-209.
- NICHOLS B. A., O'CONNOR G. R. : Penetration of mouse peritoneal macrophages by the protozoan *Toxoplasma gondii*. *Lab. Invest.*, 1981, 44, 324-335.
- REYNOLDS J. A., KASTELLO M. D., HARRINGTON D. G., CRABBS C. L., PETERS C. J., JEMSKI J. V., SCOTT G. H., DILUZIO N. R. : Glucan induced enhancement of host resistance to selected infectious diseases. *Infect. Immun.*, 1980, 30, 51-57.
- SAKAMOTO M., ISHI S., NISHIOKA K. : Heightened resistance against *Listeria monocytogenes* infection in malnourished rats after Lentinan treatment; correlation with C3 levels. *Nutr. Res.*, 1983, 3, 705-718.
- SAITO H., TOMIOKA H., YAMADA Y., JIDOI J. : Oxidative and phagocytic functions of macrophages during infections induced by mycobacterium intracellular and *Listeria monocytogenes*. *J. Gen. Microbiol.*, 1986, 132, 1117-1125.
- SHIRAHATA T., SHIMIZU K., SUZUKI N. : An *in vitro* study on lymphocyte mediated immunity in mice experimentally infected with *Toxoplasma gondii*. *Jpn. J. Vet. Sci.*, 1975, 37, 235-243.
- SINGH P. P., WHISTLER R. L. : Scleroglucan, an antitumor polysaccharide from *Sclerotium glaucicum*. *Carbohydr. Res.*, 1974, 37, 245-247.
- STADTSBAEDER S., NGUYEN B. T., CALVIN-PREVAL M. C. : Respective role of antibodies and immune macrophages during acquired immunity against Toxoplasmosis in mice. *Ann. Immunol. (Inst. Pasteur)*, 1975, 126 C, 461-474.
- STRICKLAND G. T., PETTITT L. E., VOLLER A. : Immunodepression in mice infected with *Toxoplasma gondii*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1973, 22, 452-455.
- WILLIAMS R., DILUZIO N. R. : Glucan induced modification of murine viral hepatitis. *Science*, 1980, 208, 67-69.
- WING E., BOEHMER S., CHRISTNER L. : *Toxoplasma gondii*: decreased resistance to intracellular bacteria in mice. *Exp. Parasitol.*, 1983, 56, 1-8.
-