

**Identification et caractérisation d'une protéine
recombinante β -galactosidase/Est.R1 codant
pour un antigène de sporozoïte d'*Eimeria stiedae*
(Coccidiose de lapin)**

TAZKA, H¹, REVETS, H² & HAMERS, R²

1-INRAA, CRP Mehdi Boualem, Laboratoire de Zootechnie,
BP 37 Baraki, 1620-Alger.

2-Institute of Molecular Biology and Biotechnology, Vrije Universiteit Brussel
- Paardenstraat 65 B-1640 Sint-Genesius-Rode - Belgium.

RESUME

La coccidiose est une maladie d'une importance économique majeure chez le lapin pour le développement d'un vaccin par la technique du génie-génétique dirigé contre les coccidies. Une banque d'ADN génomique d'Eimeria stiedae a été construite dans le vecteur d'expression λ gtII. Le criblage de la banque avec un antisérum de lapin dirigé contre les sporozoïtes d'E.stiedae a identifié les recombinants exprimants des antigènes d'E.stiedae. Sur 3 clones recombinants identifiés, un clone (Est. R1) positif a été choisi pour une analyse plus approfondie. Ce clone génomique contient un insert/EcoRI de 1200 pb. La séquence de ce fragment a décelé une phase ouverte de lecture de 741 nucléotides qui débute à partir du site EcoRI et correspondant à une protéine de poids moléculaire de 27.5 Kd. L'antisérum dirigé contre la protéine de fusion β -galactosidase reconnaît une protéine de 40 Kd, sur des extraits d'antigènes d'oocystes sporulés et non sporulés d'E.stiedae, et sur des oocystes sporulés d'Eimeria magna et d'Eimeria intestinalis. Une protéine de plus haut poids moléculaire (45Kd) est détectée chez Eimeria tenella (parasite du poulet). L'analyse de l'immunofluorescence indirecte a montré que cet antigène est localisé dans la région membranaire interne du sporozoïte E.stiedae et au niveau du corps réfringent chez E.magna et E.intestinalis. L'analyse de la séquence incomplète n'a révélé aucune homologie avec les séquences existantes dans les banques de données (Swiss-Prot, PC/gene et GCG software).

Mots clés : Eimeria, sporozoïte, banque génomique, antigène, vaccin génie-génétique.

ABSTRACT

Coccidiosis is a common disease in rabbits and causes a major problem in commercial rabbit production. As an initial step in the development of a genetically engineered vaccine against coccidiosis, a library of EcoRI-digested genomic DNA from *Eimeria stiedae* has been constructed in *E.coli* using the expression vector λ gtII. Screening of the library with an antiserum raised in rabbits against purified *E.stiedae* sporozoites resulted in the identification of 3 immunoreactive clones. One of these clones Est.R1, was chosen for further characterisation. This Est.R1 genomic clone, had an EcoRI insert of 1200 bp. DNA sequence analysis of Est.R1 revealed an open reading frame of 741 bp corresponding to a polypeptide of 27.5 Kd corresponding to the C-terminal end of a 40 Kd protein detected in western-blots of sporulated and non-sporulated *E.siedae* oocysts incubated with an antiserum against the recombinant β -gal/fusion protein. In addition, we demonstrated that this antigen (40 Kd) is conserved in *Eimeria magna* and *Eimeria intestinalis* while the reacting protein in *Eimeria tenella* (the chicken coccidia) showed a higher molecular weight of 45 Kd. Fluorescence staining was seen in the membrane of the parasite of *E.stiedae*; with *E.magna* and *E.intestinalis* it was localised in the refractile body. An analysis of the incomplete sequence with the Swiss-prot, PG/gene and GCG software data bank did not reveal any homology with a known sequence.

Key words : *Eimeria*, sporozoite, antigen, genomic bank, genetic engineer vaccine.

INTRODUCTION

La coccidiose est une maladie provoquée par un parasite protozoaire du genre *Eimeria*. C'est une maladie qui entraîne d'énormes conséquences économiques sur l'industrie des élevages de poulets et de lapins. Chez le lapin, il existe dix espèces différentes de coccidie, une seule parasite le foie et les neuf autres sont à localisation intestinale. Dans la maladie hépatique, le foie est considérablement hypertrophié et sa surface est marquée de nodosités blanchâtres (fig 1). Le cycle complet du protozoaire parasite, qui consiste en stades sexués et asexués, se réalise chez un hôte unique.

Cette infection entraîne une perte de poids et parfois même la mort. Les survivants à la maladie développent une immunité spécifique à l'espèce.

Actuellement, la coccidiose est contrôlée en utilisant des produits coccidiostatiques dans les aliments des jeunes animaux, mais des problèmes secondaires importants sont apparus, en particulier le développement des souches d'*Eimeria* résistantes aux médicaments. Par conséquent, une attention particulière a été portée sur l'étude de vaccins biologiques pour le contrôle de ces parasites.

Pour l'étude initiale d'un développement d'un vaccin génie-génétique, une banque d'ADN génomique d'*Eimeria stiedae* a été construite dans le vecteur d'expression λ gtII. Les fragments d'ADN ont été insérés à l'intérieur du gène qui code pour la protéine de fusion β -galactosidase. Un antisérum polyclonal de lapin dirigé contre les sporozoïtes a été utilisé pour cribler la

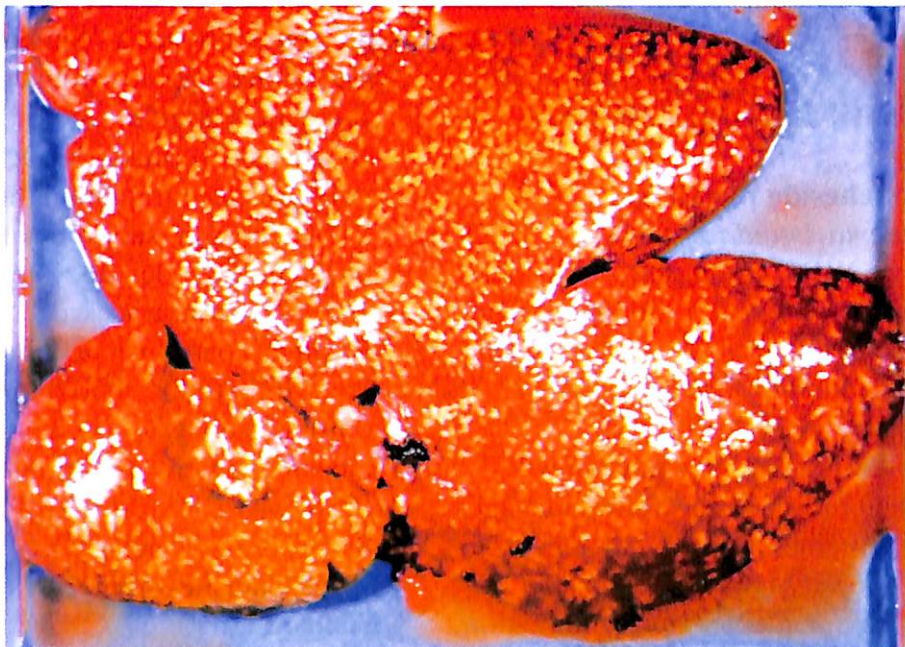


Fig.1. : Foie de lapin infecté expérimentalement avec 2×10^4 oocystes sporulés d'*E.stiedae*

banque et pour identifier les recombinants exprimant des antigènes d'*Eimeria stiedae*.

Dans cette présente étude, nous décrivons donc l'identification et la caractérisation d'un clone génomique codant pour un antigène sporozoïte d'*Eimeria stiedae*. Nous avons démontré que cet antigène est localisé dans la région membranaire du parasite et qu'il est commun aux espèces de coccidies testées.

Nous avons étudié la résolution des chromosomes d'*E.stiedae* par la technique du PFGE (Pulsed-Field-Gradient-Electrophoresis) dans le but de localiser le gène caractérisé chez cette espèce.

Cette technique, introduite par Schwarz et Cantor (1984), a facilité la caractérisation de chromosomes de plusieurs groupes d'organismes y compris les parasites du genre protozoaire.

MATERIEL ET METHODES

1 - Souches de parasites :

- *Eimeria stiedae* : U82/129, Dr Peeters, NIDO, Belgique.
- *Eimeria magna* : 1990/20, *Eimeria intestinalis* : 1990/27, Dr D.Licois, INRA. Tours, France.

2 - Infections par les parasites :

Des lapins blancs de Termonde, âgés de 5 semaines ont été infectés avec 5.10^4 oocystes sporulés d'*Eimeria stiedae*. Trois semaines après l'infection, les oocystes sont isolés du foie et des canaux biliaires. Ces oocystes sont

lavés à l'eau puis incubés (pour la sporulation) dans 2.5% de bichromate de potassium à température ambiante durant 48H.

3 - Préparation des sporozoïtes :

Les oocystes sporulés sont broyés à l'aide d'un broyeur de Potter dans une solution de PBS (149mM NaCl, 10mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 10mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, pH 7.4), et les sporocystes ainsi libérés sont incubés dans 0.25% de trypsine et 0.1% d'acide glycodeoxycholinique à 41°C pendant 30 min pour la libération des sporozoïtes. Ces sporozoïtes sont purifiés sur colonne de coton stérile selon la méthode de Bontemps et Yvoré (1974).

4 - Isolement de l'ADN d'*Eimeria stiedae* :

Les oocystes sporulés sont lavés à plusieurs reprises à l'eau pour éliminer toute trace de biochromate de potassium, puis traités avec 5.5% d'hypochlorite de sodium (NaOCI) pendant 16H à 4°C, ce traitement permet d'obtenir une fragilisation des membranes imperméables des oocystes (Hosek et al, 1988). Les traces de NaOCI sont éliminées par plusieurs lavages à l'eau (centrifugation à 3000 rpm pendant 15 min). Les oocystes sont ensuite broyés mécaniquement en milieu tamponné (25 mM EDTA, 10mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM NaCl).

Les parasites sont lysés et digérés pendant 2h à 37°C avec 1% SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) et 100 µg/ml de protéinase K.

L'ADN est purifié par extraction au phénol/chloroforme et précipité à l'éthanol (100%). Le culot d'ADN est dissout dans du TE (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA) et conservé à - 20°C (Maniatis et al, 1982).

5 - Construction et criblage d'une banque génomique dans λ gt11 :

L'ADN d'*Eimeria stiedae* a été digéré par une enzyme de restriction EcoRI sous les conditions "star" (20 mM Tris-HCl pH 8.5, 2 mM MnCl₂, 10 mM DTT) et ligué dans le vecteur d'expression λ gt11/EcoRI (fig. 2) avec la T4 DNA ligase (Huynh et al, 1986). Une banque génomique a été construite puis criblée avec un sérum polyclonal anti-sporozoïte de lapin et des clones positifs ont été isolés.

Les clones de phages positifs ont été sous-clonés et utilisés pour préparer des lysogènes dans *Escherichiacoli* de souche Y 1089 (Huynh et al, 1986). Des cultures de lysogènes ont été préparées pour l'extraction d'ADN des bactériophages recombinants et induites par adjonction d'IPTG en vue de préparer les protéines de fusion. Un des clones recombinant "Est.R1" a été choisi pour une analyse plus complète.

6 - Isolement de l'ADN du phage recombinant : Est.R1 :

L'ADN du phage a été extrait à partir du stock de phage, digéré avec l'enzyme EcoRI en présence de RNase A et analysé sur gel d'agarose (1.2%) (Maniatis et al, 1982).

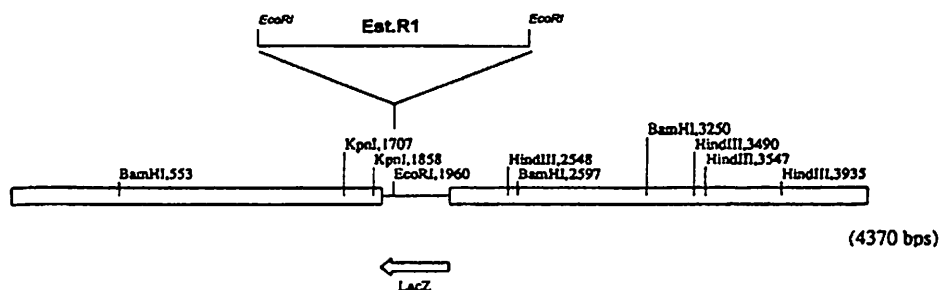


Fig.2. : Clonage dans λ gt11 (site de restriction EcoRI)

La direction de la transcription du gène lac Z est indiquée par la flèche.

7 - Préparation des lysogènes et des lysats :

Les cellules de bactérie de souche Y 1089 sont infectées avec le phage recombinant λ gt11-Est.R1 et incubées à 32°C dans un milieu nutritif solidifié (LB agar contenant 100 µg/ml d'ampicilline). Les colonies sont testées à une

température sensitive de 42°C. Les clones qui se multiplient à 32°C et non à 42°C sont assurés être des lysogènes.

Pour la préparation des lysats, on inocule dans un milieu nutritif liquide une colonie de lysogène recombinant Y 1089. La culture est incubée à 32°C jusqu'à une densité optique de 0.5.

mesurée à 600 nm (4.10^8 cellules/ml). La culture a ensuite été induite pendant 20 min à 42°C (à cette température le phage rentre dans la phase lytique), suivie de l'addition dans le milieu d'IPTG à concentration finale 10 mM.

L'induction du gène Lac Z pour la production de la protéine de fusion β -galactosidase est poursuivie pendant 60 min, à 37°C. Après centrifugation à 3000 rpm pendant 15 min, le culot de cellules est resuspendu dans du tampon Laemmli 1x [100 mM DTT (dithiotreitol), 2% SDS, 80 mM Tris-HCl pH 6.8, 10% glycérol, 0.1% bleu de bromophénol]. Les échantillons sont portés à 100°C pendant 5 min, centrifugés et le surnageant est analysé sur un gel SDS-polyacrylamide (Laemmli, 1970).

8 - Préparation de la protéine de fusion β -galactosidase :

La protéine de fusion β -galactosidase peut être purifiée directement par électrophorèse d'un gel SDS-polyacrylamide préparative de 10% (SDS-PAGE). Le gel de séparation est constitué par un gradient linéaire en acrylamide et le tampon d'électrophorèse de 25 mM Tris-HCl, 384 mM glycine, 0.1% SDS, pH 8.3. La migration en parallèle d'un haut poids moléculaire standard (Pharmacia) a été utilisée.

Après l'électrophorèse, le gel est coloré avec une solution de 0.08% bleu de coomassie G.250, 10% acide acétique, 40% méthanol; et décoloré avec 25% méthanol et 10% acide acétique.

La protéine de fusion β -galactosidase est excisée du gel puis électroéluée avec un tampon d'électroélution (25 mM Tris, 192 mM glycine, 0.1% SDS) selon la méthode de Allington et al. (1978).

Cette protéine de fusion électroéluée a été utilisée pour immuniser des lapins SPF (Specific-Pathogen-Free). INRA. Tours. France.

9 - Analyse de la protéine de fusion β -galactosidase par Western-blot :

L'analyse au Western-blot permet de vérifier la réaction de la protéine de fusion β -galactosidase avec l'antisérum spécifique anti-sporozoïte de lapin.

Les protéines contenues dans le gel sont transférées sur un filtre de nitrocellulose et la protéine de fusion est visualisée par détection immunologique (Towbin et al. 1979). Après le transfert, la membrane est incubée dans du TBS-T (150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.2, 0.05% Tween 20) et 1% BSA (Bovine Serum Albumine), pour une nuit afin de saturer tous les sites de fixation aspécifiques.

La membrane est incubée avec le premier anticorps (anti-sporozoïte de lapin 1/200) pendant 60 min pour détecter la protéine et réincuber avec le second anticorps IgG anti-lapin conjugué à la phosphatase alcaline. La réaction est développée avec le substrat de la phosphatase alcaline (100 mM NaCl, 100 mM Tris pH 9.5), 0.05% BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate), 0.1% NBT (Nitro blue tetrazolium), 8 mM $MgCl_2$.

10-Antisérum :

10-1- Sérum polyclonal ant sporozoïte de lapin :

Le sérum polyclonal anti-sporozoïte de lapin a été obtenu par immunisation avec des sporozoïtes d'*Eimeria stiedae*. Ces antigènes (10^7 sporozoïtes) ont été injectés par voie intramusculaire avec l'adjuvant complet de Freund. Les injections suivantes, à 3 semaines d'intervalles, sont effectuées avec l'adjuvant incomplet de Freund.

10-2- Sérum polyclonal anti-antigène recombinant :

Pour la production de l'antisérum recombinant, des lapins SPF (Specific-Pathogen-Free) de l'INRA, Tours France; ont été immunisés par voie sous cutanée à 3 semaines d'intervalles avec 3 doses de 100 μ g de protéine de fusion β -galactosidase électroéluée.

La 1^{ère} dose a été émulsifiée avec l'adjuvant complet de Freund et les doses suivantes avec l'adjuvant incomplet de Freund.

Les lapins ont été saignés par ponction à l'oreille 10 jours après la dernière immunisation .

11-Préparation des antigènes :

- *Eimeria stiedae* oocystes non sporulés, oocystes sporulés, sporozoïtes.
- *Eimeria magna* et *Eimeria intestinalis* : oocystes sporulés.

Les oocystes et les sporozoïtes sont broyés dans le tampon PBS (Phosphate- Buffered Saline) contenant 1 mM PMSF (Phenylmethylsulfonylfluoride) et 1 mM TLCK (N-p-tosyl-lysine-chloromethyl ketone),

inhibiteurs de prothéase, et homogénéisés dans 1% Nonidet P40 (NP 40).

Ces extraits d'antigènes sont stockés à -20°C jusqu'à utilisation.

Pour l'étude analytique sur un gel SDS-PAGE, les antigènes correspondant à 10^7 sont mélangés avec un volume égal de tampon Laemmli 2x (200 mM DTT, 4% SDS 100 mM Tris-HCl pH 6;8 20% glycérol, 0.2% bleu de bromophénol), portés à 100°C pendant 5 min et séparés sur un gel SDS-PAGE de 17.5% (Laemmli, 1970).

Les protéines sont transférées du gel sur la membrane de nitrocellulose pour l'analyse par Western-blot (Towbin et al, 1979).

12-Analyse par la méthode d'immunofluorescence indirecte :

Les sporozoïtes d'*Eimeria stiedae* sont séchés sur des lames et sont incubés avec l'anti-sporozoïte de lapin (originellement utilisé pour cribler la banque génomique) ou avec l'antisérum dirigé contre l'antigène recombinant. Le sérum avant immunisation (SPF-SN) a été utilisé comme contrôle négatif.

Après une incubation de 30 min, les parasites fixés à la lame sont lavés avec du PBS et réincubés avec l'IgG anti-lapin conjugué à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC-Sigma) pour 30 min. Après plusieurs lavages au PBS, les lames sont recouvertes de lamelles couvres objets (cover-slips) en présence de glycérol et examinés en utilisant le microscope Leitz (Wetzlar) ultraviolet épifluorescence.

Les immunofluorescences ont été également menées sur des parasites vivants et sur des sporozoïtes traités avec 3.7% de formaldéhyde pour déterminer si le sérum recombinant détecte les antigènes de surface du parasite.

13-Southern-blot génomique (Hybridation non radioactive) :

5 µg d'ADNg d'*Eimeria stiedae* ont été digérés par les enzymes de restriction suivantes : Ecor1, Pst1, BamH1; migrés sur un gel d'agarose de 0.6% et transférés sur une membrane Hybond-N (Amersham) selon la méthode de Southern (1975). L'ADN a été transféré par capillarité en utilisant le tampon 20x SSC (3M NaCl, 300 mM Na-Citrate).

La sonde d'ADN a été marquée non radioactivement par la méthode au digoxigenine (DIG) et hybridée à la membrane Hybond-N selon le protocole recommandé (Boehringer, Mannheim).

Pour la détection, la membrane a été incubée avec l'AMPPD (10 mg/ml) dilué 1/100 dans 100mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂ pH 9.5

14-Séquençage d'ADN :

L'ADN du bactériophage recombinant a été digéré avec l'enzyme de restriction EcoR1 et sous-cloné dans le plasmide pUC18 (Maniatis et al, 1982).

Un clonage de délétion du fragment génomique avec l'enzyme exonuclease III (Promega, Erase-a-Base TM System) a permis une délétion progressive et orientée de l'insert.

La séquence a été réalisée selon la méthode de "dideoxy-chain-termination" de Sanger (1977) en utilisant la polymérase du bactériophage T7 (Séquenase version 2, U.S Biochemical).

15-Résolution des chromosomes d'*Eimeria stiedae* par la technique du PFGE (Pulsed-Field-Gradient-Electrophoresis) :

Les sporozoïtes isolés d'*E. stiedae* ont été resuspendus à une concentration de 10⁸ sporozoïtes/ml dans 250 µl de PBS pH 7. Un volume égal de 1.5% "Low melting" agarose dilué dans du PBS y a été ajouté (37°C). Le mélange a été coulé dans des logettes de moules placées dans la glace pour la formation de bloc pendant 10 à 20 min.

Ces blocs sont transférés dans un tampon de lyse (0.5 M EDTA pH 9.5, 1% N-Lauroyl sarcosine (sigma), 2mg/ml de protéinase K) et incubés à 50°C pendant 48h. La solution de tampon de lyse est changée et on réincube pour une autre durée de 48h.

Ces blocs sont conservés à 4°C dans le tampon de lyse jusqu'à utilisation (Maniatis et al, 1982). Le PFGE a été mené à 14°C dans le système CHEF Mapper (Bio-Rad Electrophoresis unit).

L'électrophorèse a été réalisée suivant deux programmes sur un gel agarose de 0.8% (TAE: 40 mM Tris, 20 mM Acide Acétique glacial, 1 mM EDTA) et un tampon de migration 1 x TAE.

Le 1er programme était de 72h à 2v/cm et 20-28min 47s de temps de pulse; le 2ème de 6h 58min à 6v/cm et 4min 75s-2min 98s de temps de pulse.

Les blocs contenant *Schizosaccharomyces pombe* et *Saccharomyces cerevisiae*, conservés dans 50 mM EDTA à 4°C (Bio-Rad), ont été utilisés comme poids moléculaire standard. Les chromosomes séparés sont transférés à la membrane Hybond-N (Amersham) selon la technique de Southern (1975).

La sonde d'ADN spécifique a été marquée radioactivement en utilisant le kit "multiprisme DNA Labelling System" (Amersham) et hybridée à la membrane Hybond-N selon le protocole standard.

RESULTATS

1-Construction et criblage de la banque génomique d'*Eimeria stiedae* :

Une banque d'ADN génomique a été construite dans le vecteur d'expression λ gt11. Un total de 10^5 phages recombinants ont été criblés avec le sérum polyclonal anti-sporozoïte d'*E.stiedae*; 3 clones recombinants ont été identifiés et un de ces clones positifs, désigné sous le nom "Est.R1", a été choisi pour une analyse plus approfondie.

Ce clone a été purifié par des criblages répétitifs avec l'antisérum d'origine et l'extraction de l'ADN de ce clone recombinant (Est.R1) a déterminé un insert de 1.2 kb (fig. 3).

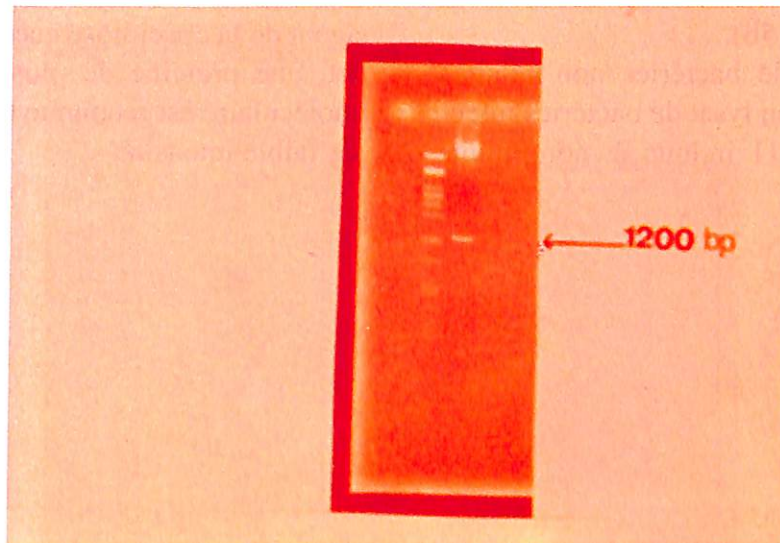


Fig.3 : Observation sur gel de l'ADN du phage recombinant Est.R1 après digestion par Eco.R1, migration en parallèle d'un marqueur λ Pst (Kb).

2-Caractérisation de la protéine de fusion β -galactosidase et de la protéine des extraits bruts des parasites de coccidie de lapin :

Pour produire la protéine de fusion recombinante, la bactérie de souche Y 1089 est lysogénisée avec le clone Est.R1. La production de cette protéine a été induite par addition dans le milieu d'IPTG. Les cellules ont été récoltées puis lysées.

Les protéines ont été séparées sur un gel SDS-polyacrylamide (SDS-PAGE) et transférées sur nitocellulose. La protéine de fusion estimée sur le gel est de 138 Kd dont 22 Kd code pour une partie de la protéine du parasite (fig. 4).

L'analyse par Western-blot confirme la réaction avec l'anti-sporozoïte d'*E.stiedae* de lapin (fig. 5a), et l'antisérum dirigé contre la protéine recombinante (fig. 5b).

Un lysat de bactéries non-induites (fig. 4.5) et un lysat de bactéries infectées par λ gt11 induits et non-induits

ont été utilisés comme contrôle.

La protéine native correspondante à l'antigène Est.R1 a été identifiée sur les extraits bruts d'oocystes non sporulés, d'oocystes sporulés et sur les sporozoïtes d'*E.stiedae*. L'antisérum SPF α Est.R1 reconnaît une protéine prédominante d'environ 40 Kd (fig. 6).

Sur d'autres espèces de coccidie de lapin (coccidiose intestinale) ce même sérum identifie une protéine de 40 Kd chez *Eimeria intestinalis* et *Eimeria magna* avec en plus deux autres bandes chez *E.magna*: une protéine de 23 Kd et une autre de 25 Kd (fig 7A, puit N°4).

Avec le sérum obtenu avant immunisation (SFP-SN), la réaction est négative, à l'exception pour *E.magna*, le sérum réagit avec la protéine de 25 Kd (fig 7B, puit N°6).

De même chez *Eimeria tenella*, agent de la coccidiose caecale du poulet, une protéine de plus haut poids moléculaire est reconnue (45Kd) mais de faible intensité.

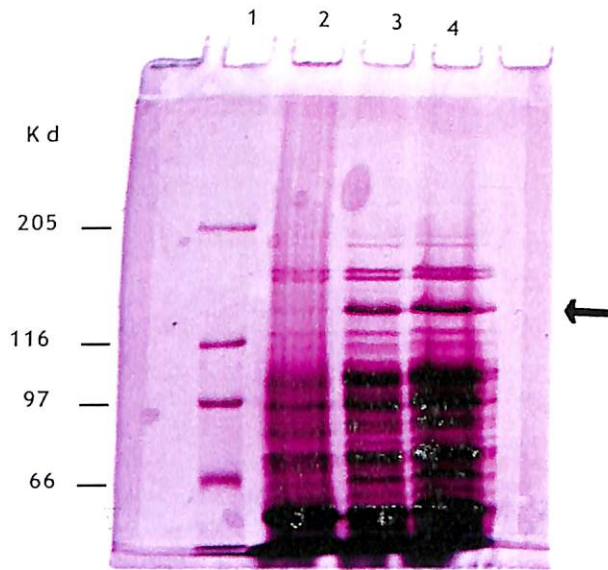


fig. 4 : Gel SDS-polyacrylamide de 10 % coloré avec le bleu de coomassie après séparation électrophorétique des protéines de lysogènes recombinants.

1 - Haut poids moléculaire standard (Kd).
 2 - Lysogène recombinant non induit.
 3,4- Lysogène recombinant induit.

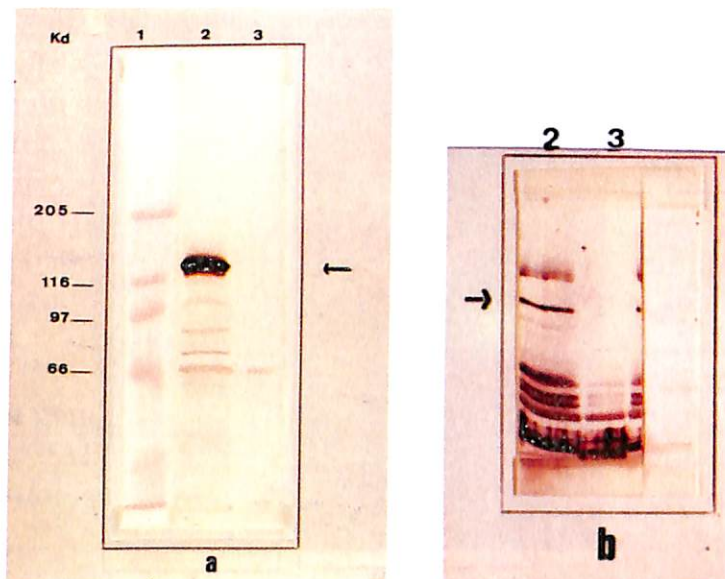


fig. 5 : Analyse par Western-Blot du phage lysogène recombinant. Régulation avec le serum anti-sporozoïte de lapin (a) et le serum recombinant SFP α Est.R1 (b).

1 - Haut poids moléculaire standard (Kd).
 2 - Lysogène recombinant induit.
 3 - Lysogène recombinant non induit.

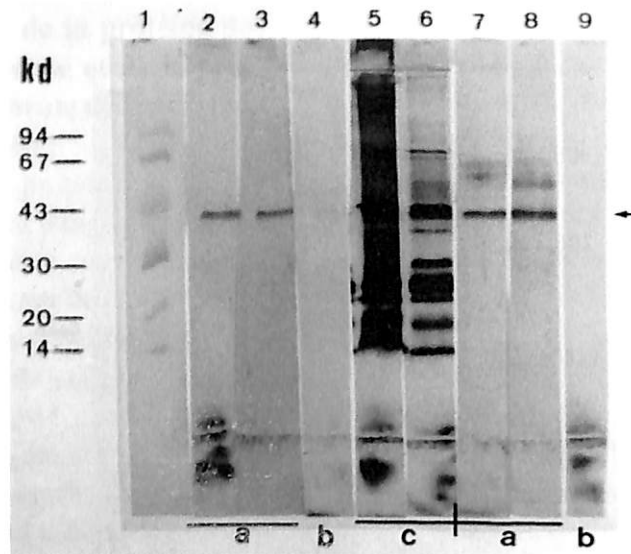


fig. 6 : Analyse par Western-Blot sur différents extraits d'antigènes d'oocystes sporulés (2,4,5) ; sporozoïtes (3) ; et oocystes non sporulés (6,7,8,9) d'*E.stiedae*. Révélation avec le serum SPFαEst.R1 (a), le préserum SPF-SN (b) et l'anti-sporozoïte de lapin (c), le marqueur bas poids moléculaire (Kd) est indiqué sur la figure.

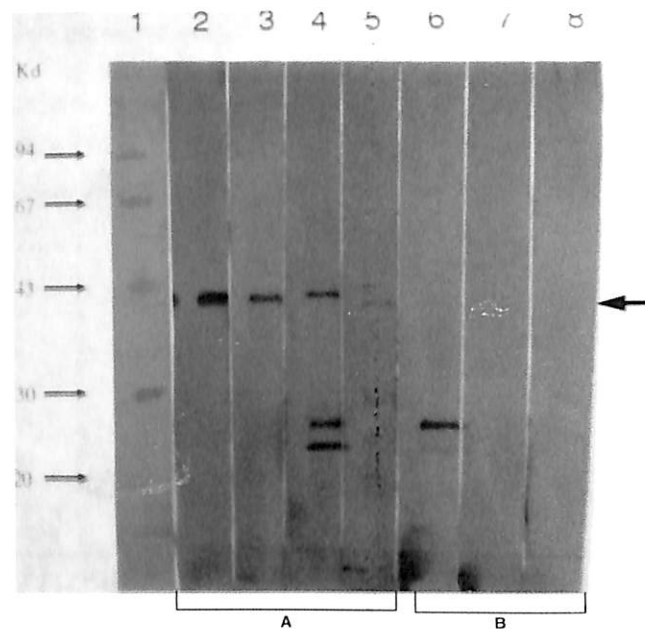


fig. 7 : Immunoblot sur différents extraits d'antigènes d'oocystes non sporulés (3), oocystes sporulés (2,7) d'*E.stiedae*, *E.magna* (4,6) et *E.intestinalis* (5,8). Les sérums utilisés sont le serum recombinant SPFαEst.R1 (A) et le préserum SPF-SN (B).

3-Immunofluorescence indirecte :

L'immunofluorescence sur des sporozoïtes d'*E.stiedae*, séchés sur des lames, révèle une réaction positive du sérum recombinant (SFP α Est.R1) au niveau de la surface et de la région apicale du parasite avec une dilution 1/50 (fig. 8c1), mais avec une dilution plus élevée (1/100) la fluorescence a été maintenue uniquement au niveau membranaire (fig. 8c2). Ce résultat a été confirmé avec les sporozoïtes intacts traités avec 3.7% de formaldéhyde (fig. 8c3). Chez les sporozoïtes vivants (sans traitement), la réaction a été négative (la figure 8 III représente les parasites vivants en lumière visible). Ce résultat démontre que l'antigène n'est pas situé à la surface du parasite mais bien au niveau de la membrane interne du sporozoïte.

Chez l'espèce *E.magna* (I), ainsi que chez *E.intestinalis* (II), une fluorescence au niveau du corps réfringent a été observée (fig. 9c). L'incubation avec le présérum (SPF-SN) a donné un résultat négatif (fig. 9a). La figure 9b représente les sporozoïtes incubés avec l'anti-sporozoïte de lapin dirigé contre *E.stiedae*.

4-Southern-blot génomique :

L'analyse de l'ADN génomique (ADNg) d'*E.stiedae*, par la technique

de Southern-blot, digéré avec les enzymes de restriction EcoR1, Pst1, BamH1, est indiquée à la figure 10.

La sonde Est.R1, marquée non radioactivement, s'hybride avec deux fragments d'ADNg digéré avec EcoR1. La taille de ces fragments sont respectivement de 5 à 3 Kb, alors que la taille du clone recombinant Est.R1 est de 1.2Kb. L'explication de ce résultat obtenu est que l'ADN génomique d'*E.stiedae* a été auparavant digéré par EcoR1 sous les conditions "star" (l'enzyme de restriction reconnaît la séquence tetranucléotide AATT à la place de la séquence hexanucléotide GAATTC) et au moment du clonage dans le vecteur λ gt11, un site EcoR1 est créé. Mais ce site n'est pas présent dans cet ADN génomique puisque l'enzyme EcoR1 dans les conditions de digestion normale a reconnu uniquement le site AATT.

Avec l'enzyme de restriction Pst1, deux fragments ont été également observés de tailles 2.7 et 2.5 Kb. Avec BamH1, un fragment unique s'hybride avec la sonde dont la taille respective est de 2.3 Kb. Ces résultats peuvent être expliqués par les données de la carte de restriction (fig. 11). L'insert contient un site Pst1 interne, mais pas de site BamH1.

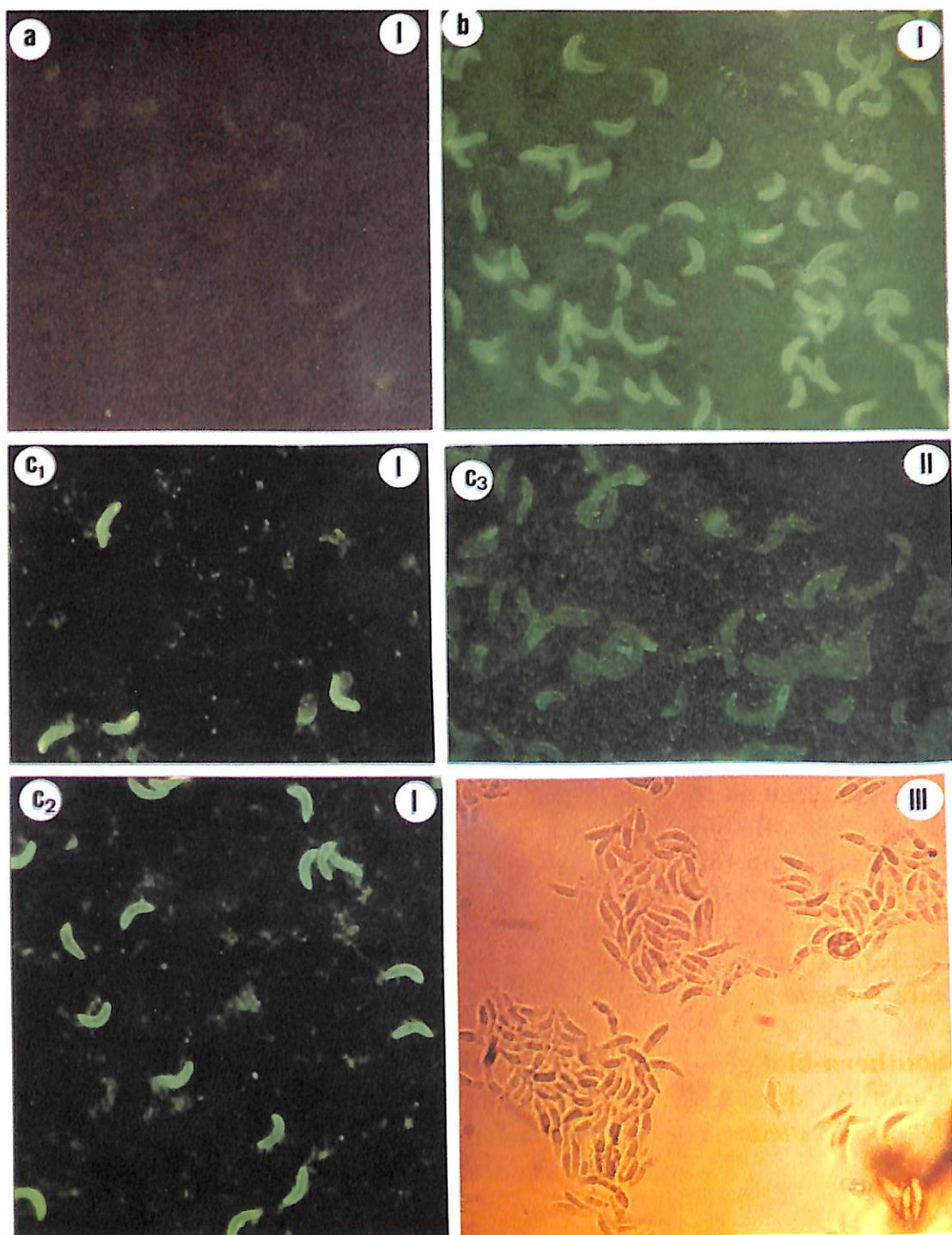


Fig. 8 : Immunofluorescence indirecte des sporozoïtes d'*E.stiedae* séchés sur lame (I) ou fixés avec 3,7 % de formaldéhyde (II) après révélation avec le présérum SPF- Σ N (a). Le sérum anti-sporozoïte de lapin (b) ou le sérum recombinant SPF α Est.R1 (c). La figure III représente les sporozoïtes vivants d'*E.stiedae* en lumière visible.

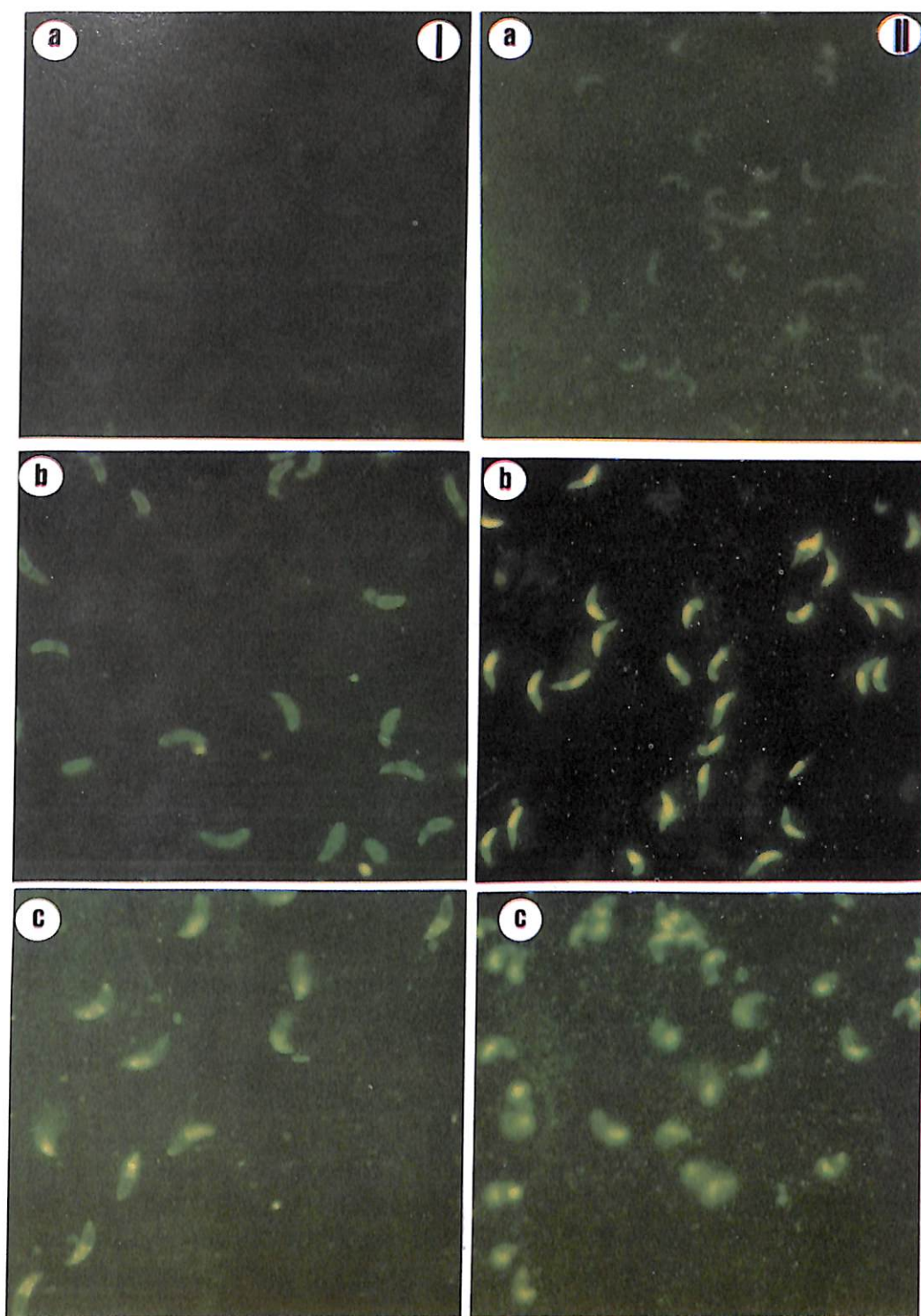


Fig. 9 : Immunofluorescence indirecte des sporozoïtes d'*E.magna* (I) et *E.intestinalis* (II) après incubation avec le présérum SPF-SN (a), de sérum anti-sporozoïte de lapin (b) ou le sérum recombinant SPF α Est.R1 (c).

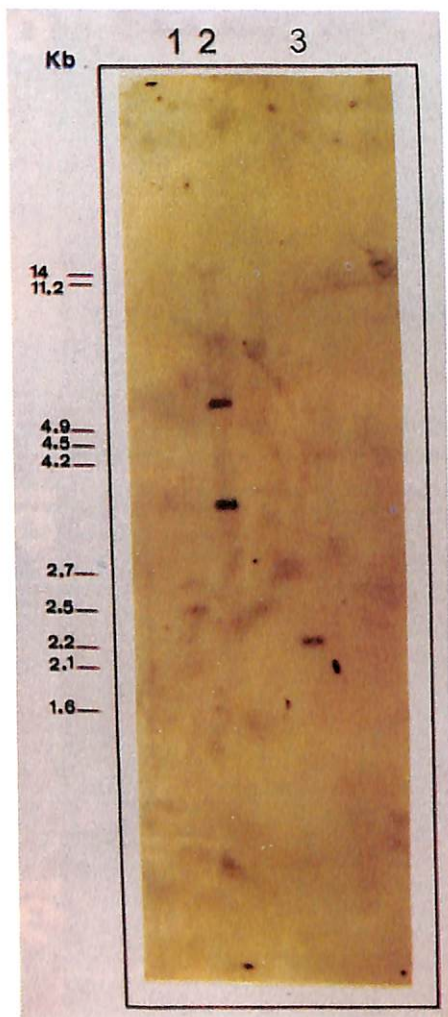


Fig. 10 : Southern-blot de l'AND génomique d'*E.stiedae*. L'ADNg a été digéré avec PstI (1) EcoRI (2), ou BamHI (3). Le marqueur standard λ Pst I (Kb) est indiqué sur la figure.

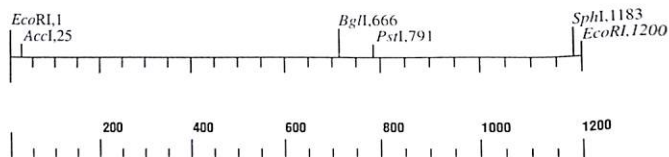


Fig. 11 : Carte de restriction du fragment d'ADNg Est.R1 (1.2 kb).

5- Analyse de la séquence du fragment d'ADN Est.R1 :

La séquence du fragment d'ADN génomique a été réalisée selon la méthode de Sanger (1974), après avoir inséré ce fragment dans le plasmide pUC18.

Le clonage de délétion du fragment génomique a été réalisé avec l'enzyme exonucléase III qui permet une délétion progressive et orientée du fragment.

La séquence de cet insert de 1.2Kb a décelé une phase ouverte de lecture de

741 nucléotides qui débute à partir du site EcoR1 et qui se termine avec un cordon stop (TAG). La protéine déduite à une longueur de 247 acides aminés avec un poids moléculaire de 27.5 Kd, comparée au poids moléculaire apparent de 22 Kd de la protéine de fusion β -galactosidase, estimée à partir de l'analyse du gel SDS-PAGE. La séquence nucléotide du clone génomique Est.R1 et sa traduction en acides aminés sont données à la figure 12.

Cette séquence a été analysée par le programme SOAP (PC/gene) selon la méthode de Kyte et Doolittle (1982) et classifiée comme étant une protéine membranaire intégrale. Le caractère hydrophobe d'une séquence d'acides aminés permet de dresser le profil

d'hydrophathie d'une protéine qui est représenté à la figure 13 et la figure 14, indique les déterminants antigéniques probables de la protéine définis selon le programme ANTIGEN, PC/gene (Hopp et Woods, 1981).

Cette séquence a été comparée aux séquences de protéines présentes dans les banques de données SWISS-PROT, PC/gene et le GCG Software, programme FASTA et BLAST. Aucune homologie significative n'a été détectée mais un score d'un pourcentage moindre a été obtenu avec les polypeptides contenant une grande proportion de résidus hydrophobiques. Les homologies entre ces séquences sont résumées au tableau suivant :

<u>Séquences</u>	<u>Position</u>	<u>Segments homologues</u>
EST.R1	134-	FLGLGVLLILV LL
ENV\$FIVPE	795-	GLGVLLLI L (1)
ENV\$FIVSD	793-	GLGILLLI L (2)
ITAL\$HUMAN	1097-	GIGGLLLL LLIF (3)
ISIASYNP7	1480-	FLGVGALLLV (4)
MERT\$SHIFL	26-	LGPLVLVALGF (5)
LAG3\$HUMAN	453-	FTLGVL\$LL LL (6)

Références :

(1) "Envelope polyprotein precursor (FIV-Petaluma)" Talbott et al, 1989; (2) "envelope polyprotein precursor (FIV-San Diego)" Philipps et al, 1990; (3) "Leukocyte adhesion glycoprotein" Larson et al, 1989; (4) "Iron stress-induced hypothetical protein (*Synechococcus sp.*)" Laudenbach et al, 1988; (5) "Mercuric transport protein (*Shigella flexneri*)" Misra et al, 1984; (6) "LAG-3 protein precursor" Triebel et al, 1990.

EcoRI
GAATTCGAAGATCAATCCGTAGACGCCGATCATCATCAGGATCAACGCCGACGTTCCGGTT
GluPheGluAspGlnSerValAspAlaAspHisHisGlnAspGlnArgAspValArgVal
1 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
TGTGATCACCATCAACAACTGAGTGCGCCAGTCCGGTTTGATCTGCTCATAGGCAAGGCC
CysAspHisHisGlnGlnLeuSerAlaProValArgPheAspLeuLeuIleGlyLysAla
61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
TCTGGTGTGAGCGAAATCCTGTTTCCGCCGACGTTTACGCTACGGCCATCTACCTGCG
SerGlyValGluArgAsnProValSerAlaArgLeuArgTyrGlyHisLeuProAla
121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
CTAGAAGATCATCACACTCGTTGCGAGGATATCGATCACATTTTCTTGAGTGTGCGTT
LeuGluAspHisHisThrArgCysGluAspIleAspHisIlePheLeuGluCysCysVal
181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
CGAGGAAAGGCTCAACGCCTCGGCCACCGCTTTTTCAGCCCAATCTACATTCCGTCCGCG
ArgGlyLysAlaGlnArgLeuGlyHisArgPhePheSerProIleTyrIleProSerAla
241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
CAATTCGGCGAGCGAGCGGATATAGGCCGTAGCATCGTTGATCGCCTTTGCCTCCATCGG
GlnPheGlyGluArgAlaAspIleGlyArgSerIleValAspArgLeuCysLeuHisArg
301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
GGTGTGCGGCATCCCGGAGGTCGTGGCATCTTCACGTTCTTTCTTGGTCTTGGTGTCTTG
GlyValArgHisProGlyGlyArgGlyIlePheThrPhePheLeuGlyLeuGlyValLeu
361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
ATCCTCGTCTCTTTCTTCTCGCCGCCCGCGAATGCGGAAATCGGTGATCTGGACCGG
IleLeuValLeuLeuSerPheAlaAlaAlaArgAsnAlaGluIleGlyAspLeuAspArg
421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480
CGTCGCACCCGAAGATTGGTCCCGGCCCATCGCTATATGGCTGGCATAAAGAATATA
ArgArgThrArgArgLeuValProGlyAlaIleAlaTyrMetAlaGlyIleLysAsnIle
481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 540
GGTGCCTGCGCTCGCCCGCGCGCGCTTGGGCTGACATATGTGGCCACGGGCACGGGC
GlyAlaCysAlaArgProAlaArgAlaLeuGlyLeuThrTyrValAlaThrGlyThrGly
541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 600
GAACGGAGGATAGCGGAATGATAGCGGCATCGAAACATCCAAACCACGAGGGTATCC
GluArgArgIleAlaArgMetIleAlaArgIleGluThrSerLysProProGlyValSer
601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 660
ATTTGCAGAATAACGAGAGGCGCGTTGCGTCCGCCCGCTTCGCAAGCCCCGCAATATAT
IleCysArgIleThrArgGlyAlaLeuArgArgProProPheAlaSerProAlaIleTyr
661 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 720
AGTCGGATAGCGCCGACCAATGATCCCTTCGACCTGCAGCACAAAGTGCTTTATGGGCGG
SerArgIleAlaProAspGlnEnd
721 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 780
CCAGAGTGGTCTGTGCATTGTTGGCAAGACCGACAACAGGATGCCAAGAAACGCTACGG
781 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 840
TAATGGAAGCAGGCACGATTATATGCAAACATTCTCCGATGATTTTCTCATCAGTT
841 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 900
CCATGGTTTAGTTTACATCAGAACATAAGGTTCTGCTACATGACTACCTGAGTTTGCCTT
901 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 960
GGGCTCAGGGATTGCGCAGTGTGAACGTGCGATGTTGTTTGATGCCGACCACTCCCG
961 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1020
ATCGAGGGCAAGGCATTTGCGTGAACCGGTATTAGCCACTCGCAAATGGTCTTCAAACC
1021 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1080
GAAGCTGTTGCCGGCTCGCACGACAATGGAGGAACTTCGCATGCTCCGCGCCAAACG
1081 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1140
CCTTGCGTTTGGCGCGACCTGATTGATGAATTC
1141 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1173

Fig.12 : Séquence nucléotide du clone génomique Est.R1 et sa traduction en acides aminés.

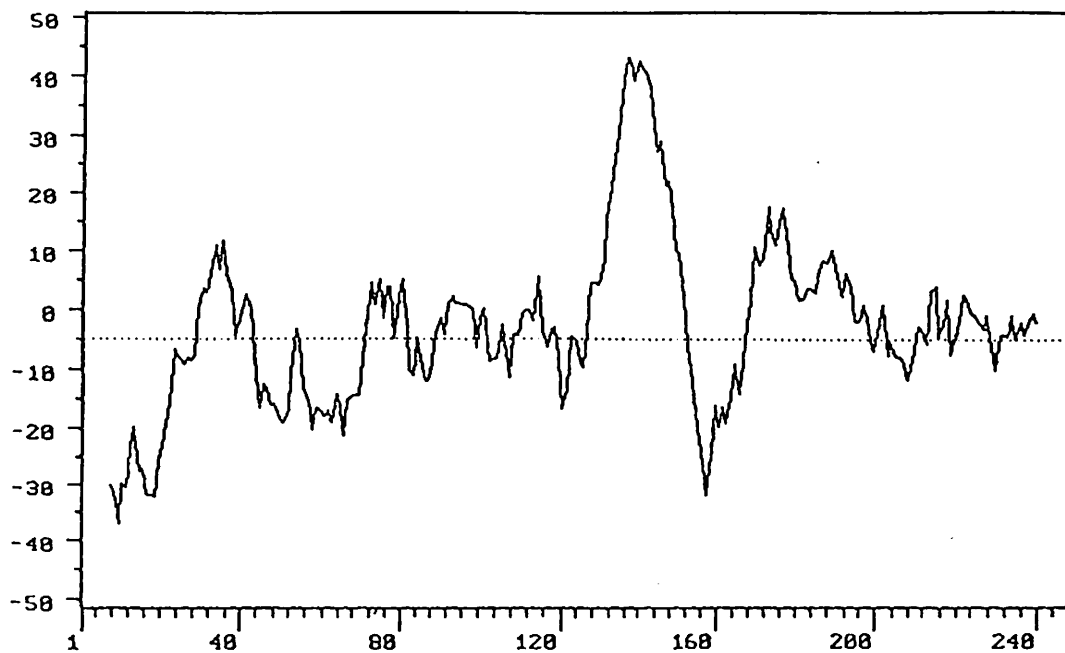


Fig.13 : Profil hydropathique de la séquence d'acides aminés du clone génomique.
L'index positif indique la région hydrophobique.

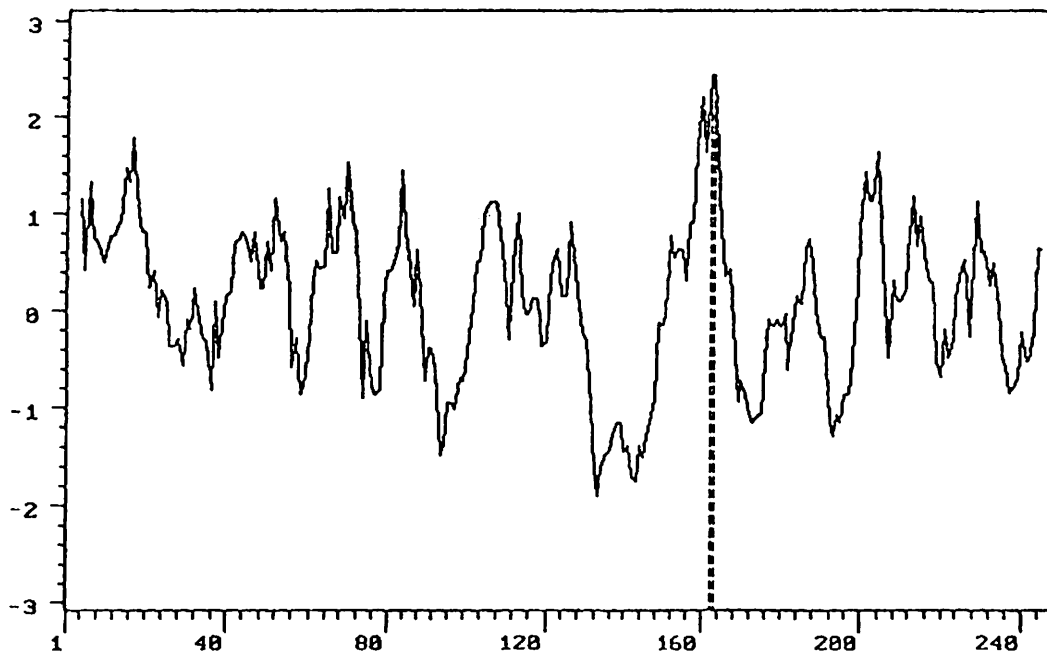


Fig.14 : Déterminant antigénique probable du clone génomique Est.R1.

6-Séparation des chromosomes de l'espèce *Eimeria stiedae* :

Dans cette présente étude, la méthodologie de PFGE a été utilisée pour pouvoir déterminer le nombre et la taille des chromosomes ainsi que la localisation du gène caractérisé chez l'espèce *E.stiedae*. Les chromosomes d'*E.stiedae* ont été séparés par électrophorèse, transférés sur membrane Hybon-N (Southern, 1974) et hybridés avec la sonde radioactive Est.R1.

La condition de migration appliquée est une séparation des chromosomes rangés du plus petit fragment 50 Kb au plus grand fragment d'ADN de 5700 Kb.

Les marqueurs standards utilisés sont : *Schizosaccharomyces pombe*

(5.7, 4.6, 3.5 mégabases) et *Saccharomyces cerevisiae* (2.5, 1.6, 1.1 mégabases).

La figure (15a) montre que l'ADN des sporozoïtes d'*E.stiedae* contient au moins 6 bandes majeures de tailles rangées approximativement de 1.1 à 5.7 mégabases et il est probable que certaines bandes de fortes intensités puissent contenir plus d'un chromosome.

Le résultat de l'hybridation avec la sonde Est.R1 radioactive montre que la sonde ne s'hybride qu'avec l'ADN d'*E.stiedae* non résolu (figure 15b). Un lavage moins sévère et une exposition autoradiographie plus prolongée n'ont révélé aucun signal additionnel d'hybridation.

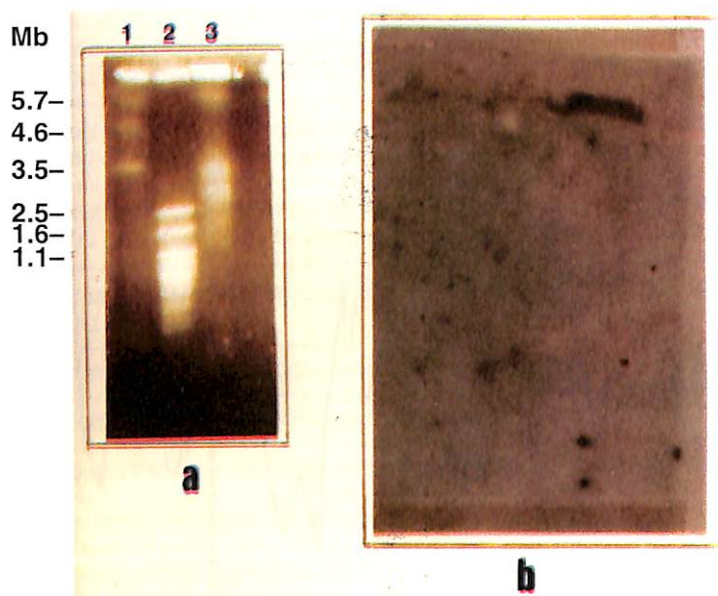


fig. 15 : Séparation de l'ADN chromosomique D'*E.stiedae* par PFGE. (a), électrophorèse sur un gel d'agarose de 0.8 % ; (b), hybridation radioactive avec la sonde Est.R1. Les poids moléculaires standards de *S. pombe* (1) et *S. cerevisiae* (2) sont indiqués en mégabases (Mb).

DISCUSSION

Le but de cette étude est de rechercher des gènes qui induisent une réponse immunitaire protectrice et qui pourrait être combinés dans un vaccin recombinant.

Cette approche a été centrée sur la construction d'une banque d'ADN génomique (ADNg) d'*E.stiedae* dans le vecteur d'expression λ gt11 et le criblage de cette banque avec le sérum polyclonal dirigé contre les sporozoïtes d'*E.stiedae*.

Le criblage approximatif de 10^5 phages recombinants a permis d'identifier 3 clones positifs et un de ces clones "Est.R1" a été sélectionné pour une étude caractéristique approfondie.

La taille de la protéine de fusion β -galactosidase/Est.R1, estimée sur un gel SDS-PAGE est de 138 Kd dont à peu près 22Kd coderait pour une partie de la protéine du parasite.

Cette protéine de fusion a été initialement identifiée par le sérum anti-sporozoïte de lapin d'*E.stiedae* en Western-Blot. Elle réagit également avec le sérum SPF α Est.R1 (antisérum dirigé contre la protéine de fusion β -galactosidase), mais pas avec le sérum SPF-SN (sérum avant immunisation).

Le sérum contre la protéine recombinante (SPF α Est.R1) reconnaît une protéine native de 40 Kd chez les sporozoïtes, les oocystes sporulés et non sporulés d'*E.stiedae*, ce qui démontre que l'antigène n'est pas synthétisé au stade sporozoïte vu qu'il est déjà pré-

sent dans les oocystes non sporulés du parasite.

Dans l'analyse des réactions croisées entre les espèces de coccidie de lapin, cet antisérum a également identifié une protéine de poids moléculaire équivalent chez les oocystes sporulés d'*E.magna* et d'*E.intestinalis*. Sur les extraits de protéine d'*E.tenella*, parasite du poulet, (la protéine reconnue quoique plus faiblement) est de 45Kd.

Ces résultats démontrent qu'il existe une réaction immunologique croisée entre les différentes espèces de coccidies. L'existence d'antigènes ou de déterminants antigéniques communs aux différentes espèces de coccidies avait déjà été rapporté (Rose, 1982; Augustine et al, 1988). Avec le sérum SPF-SN (présérum), la réaction est négative sur ces extraits de protéines.

L'analyse de l'immunofluorescence indirecte, sur les sporozoïtes d'*E.stiedae* séchés sur lames, a montré que le sérum SPF α Est.R1 réagit à la fois sur la surface et dans le cytoplasme du parasite.

Afin de déterminer si c'est un antigène de surface, ce test a été réalisé sur les parasites vivants (sans traitement) et sur les parasites vivants fixés avec 3.7% de paraformaldehyde. La conclusion obtenue est que les épitopes antigéniques d'Est.R1 sont associés avec les membranes du parasite, mais ne sont pas exposés à la surface. Si les protéines internes ont été exposées, c'est à cause de la destruction du parasite lors du séchage sur les

lames. Cet antigène paraît donc être un antigène immunodominant interne.

Cet antisérum, qui a des réactions croisées dans l'analyse en Western-blot, a également des réactions croisées dans la procédure d'immunofluorescence indirecte. Avec les sporozoïtes d'*Eimeria magna*, et *Eimeria intestinalis* l'antisérum réagit spécifiquement avec le corps réfringent. En général, la fonction du corps réfringent est inconnue; mais chez les espèces qui infectent la volaille, Danforth et Augustine (1989) ont caractérisé un anticorps monoclonal dirigé contre le corps réfringent des sporozoïtes d'*Eimeria tenella* et un traitement avec cet anticorps inhibait *in vitro* le développement de la première et de la deuxième génération des schizontes. Le corps réfringent pourrait donc probablement jouer un rôle dans le développement préliminaire du parasite.

L'insert Est.R1 (1.2 Kb) a été électroélué, purifié et marqué non radioactivement pour l'étude analytique par Southern-blot de l'ADN génomique.

Les résultats constatés sont que la sonde Est.R1 s'hybride avec un simple fragment d'ADNg digéré avec l'enzyme de restriction BamH1, alors que 2 bandes d'une intensité similaire ont été observées avec l'ADNg digéré avec l'enzyme EcoR1 et d'une intensité moindre avec Pst1.

A l'exception des deux bandes trouvées dans l'ADNg digéré avec EcoR1, ces résultats peuvent être expliqués

par les données de la carte de restriction. L'insert Est.R1 contient un site Pst1 interne, mais pas le site BamH1.

A travers ces résultats, l'hypothèse suggérée est que le gène existe probablement en une copie dans le génome par le fait qu'une bande hybridée a été observée sur l'ADNg digéré avec BamH1.

Le séquençage du fragment génomique a été réalisé selon la méthode de Sanger (1974). La protéine déduite a une longueur de 247 acides aminés avec un poids moléculaire de 27.5 Kd proche de 22 Kd estimés sur le gel. La taille de la protéine de fusion produite par ce clone indique que 62% du total de l'insert 1.2 Kb code pour la protéine du parasite.

La séquence d'acides aminés, analysée par la méthode de Kyte et Doolittle (1982), a été classifiée comme contenant un segment membranaire.

Cette séquence a été comparée aux séquences de protéines existantes en utilisant le programme de SWISS-PROT, PC/gene et le programme de GCG Software, la constatation est qu'il n'existe pas d'homologies significatives avec ces séquences.

Cette séquence ne contient pas d'acides aminés répétitifs comme il a été rapporté pour plusieurs antigènes isolés à partir des différentes espèces de *Plasmodium* (Weber, 1988) et également dans les séquences de certains gènes d'espèces d'*Eimeria* (Jenkins, 1988; Liberator et al. 1989).

Les données de cette séquence ont été soumises à l'EMBL (European Molecular Biology Laboratory) sous le numéro d'accès : Z 33907.

Dans cette présente étude, le PFGE a été utilisé pour fractionner l'ADN génomique d'*E.stiedae* et pour localiser le gène caractérisé chez cette espèce.

Les tailles des chromosomes ont été déterminées par comparaison avec l'ADN des chromosomes connus de *Schizosaccharomyces pombe* et *Saccharomyces cerevisiae*.

Cette technique a permis de résoudre au moins 6 chromosomes pour *E.stiedae*. Certains chromosomes ont parallèlement migré en une même position du gel du fait de l'intensité plus forte de certaines des bandes colorées au bromure d'éthidium.

Les résultats du Southern-blot révèlent que la sonde radioactive Est.R1 s'hybride seulement avec la large bande d'ADN non résolu, située dans le haut du gel.

Ceci pourrait vouloir dire que les chromosomes séparés sous ces conditions d'électrophorèse n'ont pas été complètement résolus et que le gène localisé chez l'espèce *E.stiedae* devrait avoir une taille supérieure à 5.7 mégabases. Des conditions d'électrophorèses requises pour la séparation de chromosomes plus grands que 5 Mb doivent être utilisées pour l'obtention d'une résolution plus complète.

Parmi les espèces d'*Eimeria*, *E.tenella* (espèce la plus pathogène chez la volaille) est l'une des coccidies

dont les chromosomes ont été caractérisés. Shirley et al, (1990) ont identifié au moins 12 chromosomes.

CONCLUSION

Des progrès considérables, en biologie moléculaire et en immunologie, ont été obtenus dont certains ont été à profit dans la recherche de vaccins à ADN combinant pour le contrôle des maladies infectieuses humaines ou animales.

La recherche biotechnologique dans l'étude des parasites protozoaires, plus particulièrement le parasite de la malaria humaine (Cox, 1991, Patarroyo et al, 1987; 1988) a ouvert la voie pour des efforts similaires dans le domaine de la parasitologie vétérinaire. Sur la base de ces travaux, des études similaires ont été réalisées dans le but de lutter contre la coccidiose principalement aviaire, du fait de son importance économique. La majorité des travaux menés sur la caractérisation des antigènes du genre *Eimeria* a été axée sur le premier stade de développement du parasite car il est intéressant de rechercher une immunité vis-à-vis de ce stade chez l'hôte.

Des efforts considérables ont été déployés dans l'identification des protéines de surface des sporozoïtes, des mérozoïtes des espèces d'*Eimeria* et également des antigènes internes et/ou des molécules sécrétrices ayant des rôles importants et pouvant être des cibles intéressantes. C'est ainsi que des différents types d'antigènes

ont été caractérisés chez le genre *Eimeria* : des antigènes internes principalement localisés dans le corps réfringent (Danforth et Augustine, 1989), les rhoptries (Jenkins et al, 1990) et les micronèmes (Tomley et al, 1991). Jenkins et al, 1990 ont détecté des protéines de surface et des rhoptries sur les mérozoïtes d'*Eimeria acervulina*. Ces protéines activent les lymphocytes T des poulets immuns.

Parmi les antigènes actuellement isolés, peu de travaux ont été réalisés au niveau des gamètes, cependant Wallach et al, (1989); Fried et al, (1992) ont démontré que des antigènes gamétocytes pourraient bloquer la transmission en interrompant le cycle du parasite.

Dans ce travail, nous avons caractérisé une protéine recombinante qui code pour un nouvel antigène sporozoïte d'*Eimeria stiedae*; nous avons démontré que :

- cet antigène est localisé dans la région membranaire du parasite et présent chez les espèces de coccidie de lapin testés (*E.magna* et *E.intestinalis*) ainsi que chez *E.tenella* espèce parasitant le poulet.

Chez les espèces *E.magna* et *E.intestinalis*, cet antigène est localisé au niveau du corps réfringent. En général, la fonction du corps réfringent est inconnue, mais certains auteurs ont rapporté qu'il pourrait jouer un rôle important dans le développement préliminaire du parasite du fait que cette organelle change en

nombre, forme et localisation lors de l'invasion dans la cellule hôte (Chobotar et Scholtyseck, 1982).

Augustine et al, (1988) ont suggéré que l'inhibition de l'activité du corps réfringent pourrait résulter dans la réduction du développement intracellulaire du parasite.

De plus comme les coccidioses sont dues à des infections mixtes par différentes espèces du genre *Eimeria*, il est d'une importance primordiale d'obtenir un antigène protecteur commun aux espèces dominantes de coccidies.

D'autres approches détermineront si cet antigène recombinant, qui est partagé entre les espèces de coccidies, a la capacité d'induire une protection contre une infection d'*Eimeria*..

Références bibliographiques :

- Allington, W.B., Cording, A.L., McCullough, G.A. Mitchell, D.E. and Nelson, J.W. (1978). Electrophoretic concentration of macromolecules. Anal. Biochem. 85, 188-196
- Augustine, P.C., Danforth, H.D. and McAndrew, S.J. (1998). Monoclonal antibodies reveal antigenic differences in refractile bodies of avian *Eimeria* sporozoites J. Parasitom. 74, 653-659
- Bontemps, M., Yvoré, P. (1974). Technique de purification des suspensions de sporozoïtes d'*Eimeria* sur colonne de fibres synthétiques. Ann. Rech. Vét. 5, 109-113.

- Chobotar, B. Scholtyssek, E. (1982).**
Ultrastructure in the biology of the Coccidia, P.L. Long (ed.). University Park Press, Baltimore, Maryland pp 101-165.
- Cox, F.E.G (1991).** Review : Malaria vaccines, progress and problems. Tib. Tech. 9,389-394.
- Danforth, H.D. and Augustine, P.C. (1986).**
Use of hybridoma antibodies and recombinant DNA technology in protozan vaccine development. Avian. Dis. 30, 37-42.
- Fried, M., Mencher, D., Sar-Shalom, O. and Wallach, M. (1992).** Developmental gene expression of a 230 Kilodalton macrogamete-specific protein of avian coccidial parasite *Eimeria maxima*. Mol. Biochem. Parasitol. 51, 251-262.
- Huynh, TV., Young, R.A. and Davis, R.W. (1986).** Construction and screening cDNA libraries in lambda gt10 and lambda gt11. (In DNA Cloning. Glover, DM) IRL Press, Oxford-Washington DC. PC. pp 49-78.
- Jenkins, M.C., Lillehoj, H.S., Barta, J.R., Danforth, H.D. and Strohle, D.A. (1990)** *Eimeria acervulina* : Cloning of cDNA encoding an immunogenic region of several related merozoite surface and rhoptry proteins. Exp. Parasitol. 70, 353-362.
- Kyte, J. and Doolittle, R.F. (1982).**
A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. Jour. Mol. Biol. 157, 105-132.
- Larson, R.S., Corbi, A.L., Berman, L., Springer, T. (1989).** Primary structure of the leucocyte function-associated molecule-1 α subunit : an integrin with an embedded domain defining a protein superfamily. J. Cell. 108, 703-712.
- Laudenbach, D.E. Straus, N.A. (1988).**
Characterization of a cyanobacterial iron stress-induced gene similar to psbC. J. Bacteriol. 170, 5018-5026.
- Laemmli, U.K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227, 680-685.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J. (1982).** Molecular cloning A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring harbor, NY.
- Misra, T.K., Brown, N.L., Fritzinger, D.C., Pridmore, R.D., Barnes, W.M., Habestroh, L., Silver, S. (1984).** Mercuric ion-resistance operons of plasmid R 100 and transposon Tn501 : The beginning of the operon including the regulatory region and the first two structural genes. Proc. nat.Acad. Sci. USA. 81, 5975-5979.
- Patarroyo, M.E., Romero, P., Torres, M.L., Clavijo, P., Moreno, A. Martinez, A. Rodriguez, R. Guzman, F. and Gabezs, E. (1987).** Induction of protective immunity against experimental infection with malaria using synthetic peptides. Natu. 328, 629-632.
- Patarroyo, M.E., Amador, R., Clavijo, P., Moreno, A., Guzman, F. Romero, P., Tascon, R., Franco, A., Murillo, L.A., Ponton, G. and Trujillo, G., (1988).** A synthetic vaccine protect humans against challenge with asexual blood stages of *Plasmodium falciparum* malaria. Nature. 332, 158-161.
- Phillips, T.R., Talbott, R.L., Lamon, C., Muir, S., Lovelace, K., Elder, J.H. (1990).** Comparison of two hosts cells range variants of feline Immunodeficiency Virus. J. Virol. 64, 4605-4613.

- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977).** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 74, 503-517.
- Southern, E.M. (1975).** Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98, 503-517.
- Talbott, R.L., Sparger, E.E., Lovelace, K.M., Fitch, W.M., Pederson, N.C., Luciw, P.A., Elder, J.H. (1989).** Nucleotide sequence and genomic organisation of Feline Immunodeficiency Virus. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 86, 5743-5747.
- Tomley, F.M., Clarke, L.E., Kawazone, U., Dijkema, R. and Kok, J.J. (1991).** Sequence of the gene encoding an immunodominant microneme protein of *Eimeria tenella*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 49, 277-288.
- Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979).** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets : Procedure and some applications. *Proc. Bioch. Parasitol.* 21, 7-15.
- Triebel, F., Jitskawa, S., Baixeras, E., Roman, S., Genevee, C., Viegas-Pequignot, E., Hercend, T. (1990).** LAG-3, a novel lymphocyte activation gene closely related to CD4. *J. Exp. Med.* 171, 1393-1405.
- Wallach, M.G., Mencher, D., Yarush, S., Pillemer, G., Hallabi, A. and Pugatsh, T. (1989).** *Eimeria maxima* : Identification of gametocyte protein antigen and their possible role in protective immunity. *Exp. Parasitol.* 68, 49-56.