ÉCOLE NATIONALE VETERINAIRE D'ALFORT

Année 2010

PLACE DU CHAT DANS LA CIRCULATION DE LA TOXOPLASMOSE.

OBJECTIFS, INTERET ET ETAT DES LIEUX DE LA VACCINATION.

THESE

Pour le

DOCTORAT VETERINAIRE

Présentée et soutenue publiquement devant

LA FACULTE DE MEDECINE DE CRETEIL

Le 18 mars 2010

par

Soline DION

Née le 16 décembre 1984 à Nogent sur Marne (Val de Marne)

JURY

Président : M.
Professeur à la Faculté de Médecine de CRETEIL

Membres
Directeur : Mademoiselle Lénaïg HALOS
Maître de conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort

Assesseur : Monsieur Ludovic FREYBURGER
Maître de conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort

Février 2010

LISTE DES MEMBRES DU CORPS ENSEIGNANT

Directeur : M. le Professeur MIALOT Jean-Paul

Directeurs honoraires : MM. les Professeurs MORAILLON Robert, PARODI André-Laurent, PILET Charles, TOMA Bernard

Professeurs honoraires: MM. BRUGERE Henri, BUSSIERAS Jean, CERF Olivier, CLERC Bernard, CRESPEAU François LE BARS Henri, MOUTHON Gilbert, MILHAUD Guy, ROZIER Jacques,

DEPARTEMENT DES SCIENCES BIOLOGIQUES ET PHARMACEUTIQUES (DSBP)

Chef du département : Mme COMBRISSON Hélène, Professeur - Adjoint : Mme LE PODER Sophie, Maître de conférences

- UNITE D'ANATOMIE DES ANIMAUX DOMESTIQUES
Mme CREVIER-DENOIX Nathalie, Professeur
M. DEGUEURCE Christophe, Professeur
Mme ROBERT Céline, Maître de conférences
M. CHATEAU Henry, Maître de conférences*

- UNITE DE PATHOLOGIE GENERALE MICROBIOLOGIE, IMMUNOLOGIE
Mme QUINTIN-COLONNA Françoise, Professeur*
M. BOULOUIS Henri-Jean, Professeur
M. FREYBURGER Ludovic, Maître de conférences

- UNITE DE PHYSIOLOGIE ET THERAPEUTIQUE
Mme COMBRISSON Hélène, Professeur*
M. TIRET Laurent, Maître de conférences
Mme STORCK-PILOT Fanny, Maître de conférences

- UNITE DE PHARMACIE ET TOXICOLOGIE
Mme ENRIQUEZ Brigitte, Professeur
M. TISSIER Renaud, Maître de conférences*
M. PERROT Sébastien, Maître de conférences

- DISCIPLINE : ETHOLOGIE
M. DEPUTTE Bertrand, Professeur

-UNITE D'HISTOLOGIE, ANATOMIE PATHOLOGIQUE
M. FONTAINE Jean-Jacques, Professeur *
Mme BERNEX Florence, Maître de conférences
Mme CORDONNIER-LEFORT Nathalie, Maître de conférences
M. REYES GOMEZ Edouard, Maître de conférences contractuel

- UNITE DE VIROLOGIE
M. ELOIT Marc, Professeur *
Mme LE PODER Sophie, Maître de conférences

- UNITE DE GENETIQUE MEDICALE ET MOLECULAIRE
M. PANTHIER Jean-Jacques, Professeur
Mme ABITBOL Marie, Maître de conférences*

- UNITE DE BIOCHIMIE
M. MICHAUX Jean-Michel, Maître de conférences*
M. BELLIER Sylvain, Maître de conférences

- DISCIPLINE : ANGLAIS
Mme CONAN Muriel, Professeur certifié

- DISCIPLINE : EDUCATION PHYSIQUE ET SPORTIVE
M. PHILIPS, Professeur certifié

DEPARTEMENT D'ELEVAGE ET DE PATHOLOGIE DES EQUIDES ET DES CARNIVORES (DEPEC)

Chef du département : M. POLACK Bruno, Maître de conférences - Adjoint : M. BLOT Stéphane, Professeur

- UNITE DE MEDECINE
M. POUCHELON Jean-Louis, Professeur*
Mme CHETBOUL Valérie, Professeur
M. BLOT Stéphane, Professeur
M. ROSENBERG Charles, Maître de conférences
Mme MAUREY Christelle, Maître de conférences
Mme BENCHEKROUN Ghita, Maître de conférences contractuel

- UNITE DE CLINIQUE EQUINE
M. DENOIX Jean-Marie, Professeur
M. AUDIGIE Fabrice, Professeur*
Mme GIRAUDET Aude, Praticien hospitalier
Mlle CHRISTMANN Undine, Maître de conférences
Mme MESPOULHES-RIVIERE Céline, Maître de conférences contractuel
Mme PRADIER Sophie, Maître de conférences contractuel
M. CARNICER David, Maître de conférences contractuel

- UNITE DE REPRODUCTION ANIMALE
Mme CHASTANT-MAILLARD Sylvie, Professeur (rattachée au DPASP)
M. NUDELMANN Nicolas, Maître de conférences
M. FONTBONNE Alain, Maître de conférences*
M. REMY Dominique, Maître de conférences (rattaché au DPASP)
M. DESBOIS Christophe, Maître de conférences
Mme CONSTANT Fabienne, Maître de conférences (rattachée au DPASP)
Mme DEGUILLAUME Laure, Maître de conférences contractuel (rattachée au DPASP)

- DISCIPLINE : URGENCE SOINS INTENSIFS
Mme Françoise ROUX, Maître de conférences

- UNITE DE PATHOLOGIE CHIRURGICALE
M. FAYOLLE Pascal, Professeur *
M. MOISSONNIER Pierre, Professeur
M. MAILHAC Jean-Marie, Maître de conférences
M. NIEBAUER Gert, Professeur contractuel
Mme VIATEAU-DUVAL Véronique, Maître de conférences
Mme RAVARY-PLUMIOEN Bérangère, Maître de conférences (rattachée au DPASP)
M. ZILBERSTEIN Luca, Maître de conférences
M. JARDEL Nicolas, Praticien hospitalier

- UNITE D'IMAGERIE MEDICALE
Mme BEGON Dominique, Professeur*
Mme STAMBOULI Fouzia, Praticien hospitalier

- DISCIPLINE : OPHTALMOLOGIE
Mme CHAHORY Sabine, Maître de conférences

- UNITE DE PARASITOLOGIE ET MALADIES PARASITAIRES
M. CHERMETTE René, Professeur *
M. POLACK Bruno, Maître de conférences
M. GUILLOT Jacques, Professeur
Mme MARIGNAC Geneviève, Maître de conférences
M. HUBERT Blaise, Praticien hospitalier

- UNITE DE MEDECINE DE L'ELEVAGE ET DU SPORT
M. GRANDJEAN Dominique, Professeur *
Mme YAGUIYAN-COLLIARD Laurence, Maître de conférences contractuel

- DISCIPLINE : NUTRITION-ALIMENTATION
M. PARAGON Bernard, Professeur

DEPARTEMENT DES PRODUCTIONS ANIMALES ET DE LA SANTE PUBLIQUE (DPASP)

Chef du département : M. MILLEMANN Yves, Maître de conférences - Adjoint : Mme DUFOUR Barbara, Professeur

- UNITE DES MALADIES CONTAGIEUSES
M. BENET Jean-Jacques, Professeur*
Mme HADDAD/ HOANG-XUAN Nadia, Professeur
Mme DUFOUR Barbara, Professeur
Melle PRAUD Anne, Maître de conférences contractuel

- UNITE D'HYGIENE ET INDUSTRIE DES ALIMENTS D'ORIGINE ANIMALE
M. BOLNOT François, Maître de conférences *
M. CARLIER Vincent, Professeur
Mme COLMIN Catherine, Maître de conférences
M. AUGUSTIN Jean-Christophe, Maître de conférences

- DISCIPLINE : BIOSTATISTIQUES
M. DESQUILBET Loïc, Maître de conférences contractuel

- UNITE DE ZOOTECHNIE, ECONOMIE RURALE
M. COURREAU Jean-François, Professeur
M. BOSSE Philippe, Professeur
Mme GRIMARD-BALLIF Bénédicte, Professeur
Mme LEROY Isabelle, Maître de conférences
M. ARNE Pascal, Maître de conférences
M. PONTER Andrew, Professeur*

- UNITE DE PATHOLOGIE MEDICALE DU BETAIL ET DES ANIMAUX DE BASSE-COUR
M. MILLEMANN Yves, Maître de conférences *
Mme BRUGERE-PICOUX Jeanne, Professeur (rattachée au DSBP)
M. ADJOU Karim, Maître de conférences
M. TESSIER Philippe, Professeur contractuel
M. BELBIS Guillaume, Maître de conférences contractuel

* Responsable de l'Unité

REMERCIEMENTS

Au Professeur de la Faculté de Médecine de Créteil,

Pour nous faire l'honneur d'accepter la présidence de ce jury de thèse,

Hommage respectueux.

A Mademoiselle Lénaïg HALOS,

Maître de conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort,

Pour m'avoir accompagnée dans la réalisation de ce travail,

Sincères remerciements.

A Monsieur Ludovic FREYBURGER,

Maître de conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort,

Pour avoir accepté d'y apporter sa contribution,

Sincères remerciements.

A mes parents et ma sœur,

A qui je témoigne toute ma reconnaissance pour leur soutien et leurs encouragements dans les études comme dans la vie en général…

A mes mamies : Mamie Lau et Mamie Co,

A toute ma famille et aux amis de la famille,

Qui m'ont vu grandir et m'ont fait grandir.

A tous mes amis,

D'enfance, de lycée, de prépa, d'Alfort et du Sud…bonne route à tous, en espérant qu'elle continue à croiser la mienne.

A mes anciens,

Pour avoir guidé mes premiers et derniers pas dans cette école, et surtout m'avoir sans cesse rappelée au travail de la thèse …

A François,

Qui m'a accompagnée tout au long de ce dur labeur, maigre étape je l'espère, de notre longue traversée.

A Mystic et Be Good,

Qui m'ont, malgré-eux, soufflé une vocation !

SOMMAIRE

LISTE DES ILLUSTRATIONS 3

LISTE DES ABREVIATIONS 5

LEXIQUE PARASITOLOGIQUE 9

INTRODUCTION 13

I. RAPPELS SUR LA TOXOPLASMOSE 15

A. L'agent pathogène : *Toxoplasma gondii* 15

1. Classification 15
2. Morphologie et résistance des différentes formes évolutives 17

B. Caractères biologiques et cycle de développement parasitaire 23

1. Caractères biologiques 23
2. Le cycle de développement du toxoplasme 26

C. Les influences de la toxoplasmose en santé vétérinaire et santé publique 33

1. Impacts en santé vétérinaire 33
2. Impacts en santé publique 36
3. Méthodes de lutte et de prévention 40

II. IMPORTANCE DU CHAT DANS LA CIRCULATION DE *TOXOPLASMA GONDII*. 43

A. Rappels 43

1. La toxoplasmose féline 43
2. L'immunité anti-toxoplasme chez l'hôte définitif 46
3. Méthodes diagnostiques 57
4. Traitement de la toxoplasmose féline 61

B. Epidémiologie de la toxoplasmose féline 62

1. Prévalence humaine et présence de félidés 62
2. Prévalence féline 63

C. Le chat, hôte définitif, excréteur d'ookystes 66

1. Excrétion d'ookystes lors de contamination par ingestion de bradyzoïtes 67
2. Contamination lors d'ingestion de tachyzoïtes 67
3. Contamination lors d'ingestion d'ookystes 67
4. Chronologie différentielle de l'excrétion des ookystes et de la sérologie selon le mode d'infection 67
5. L'excrétion d'ookystes lors de réinfection et de réactivation 68

III. LA VACCINATION ANTI-TOXOPLASMIQUE FELINE 71

A. Objectifs et principes de la vaccination anti-toxoplasmique 72
1. Objectifs de la vaccination anti-toxoplasme et problématique vaccinale 72
2. Antigènes de *Toxoplasma gondii* 74
3. Vectorisation des antigènes de *Toxoplasma gondii* 80
4. Adjuvants utilisés 84
5. Voies d'immunisation 87

B. Les modèles d'étude et les essais de laboratoire 89
1. Modèles animaux 89
2. Evaluation de l'efficacité vaccinale 91
3. Vaccins vivants atténués 91
4. Vaccins inactivés 95

C. La vaccination féline 100
1. Vaccin déjà élaboré : un vaccin vivant atténué 100
2. Etudes de terrain 103
3. Essais vaccinaux chez le chat. 108
4. Bilan des études vaccinales menées sur le chat 110

CONCLUSION 115

BIBLIOGRAPHIE 117

LISTE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1: Schéma d'un tachyzoïte de *Toxoplasma gondii* 18

Illustration 1 : Tachyzoïtes (souche RH) formant des pseudokystes dans une cellule infectée (fibroblaste MRC5) (× 400) 20

Illustration 2 : Kyste à bradyzoïtes dans du tissu musculaire (MO : Microscope Optique× 400). 20

Figure 2: Ookystes immatures 21

Figure 3: Ookyste sporulé : deux sporocystes renfermant chacun quatre sporozoïtes 22

Figure 4: Multiplication endodyogénique de *Toxoplasma gondii* 24

Figure 5: Cycle évolutif de *Toxoplasma gondii* 27

Figure 6: Sources et modes de contamination humaine par *Toxoplasma gondii* 36

Photo 1: Lésions oculaires chez un chat atteint de toxoplasmose 46

Figure 7: Résultats des sérologies pour la toxoplasmose (IgM et IgG) et de la coproscopie dans un groupe de 17 chats contaminés expérimentalement par ingestion de bradyzoïtes (>10^3 de la souche ME 49) 48

Figure 8: Réponse immune non spécifique et initiation de la réponse T adaptative (modèle murin) 49

Figure 9: Interactions entre les différents types cellulaires intervenant dans les mécanismes immunitaires à médiation cellulaire lors d'une infection par *Toxoplasma gondii* 51

Illustration 3: Vacuole parasitophore contenant des toxoplasmes, associée avec une mitochondrie de la cellule hôte (Mito) et son réticulum endoplasmique (ER). 53

Illustration 4 : A.Oocystes non sporulés (non infectants) émis dans les fèces de chat B.Oocyste sporulé, infectant, après quelques jours dans le milieu extérieur 59

Tableau 1: Prévalence de la toxoplasmose chez le chat dans le monde en fonction du mode de vie 64

Tableau 2: Prévalence sérologique chez les félidés sauvages dans le monde 65

Tableau 3: Etude de la présence d'ookystes de *Toxoplasma gondii* dans les matières fécales du chat dans le monde 66

Figure 10: Chronologie différentielle de l'excrétion d'ookystes et de la sérologie chez le chat selon le mode d'infection. 68

Tableau 4: Divers antigènes de *Toxoplasma gondii* utilisés dans les études vaccinales et spécificités de stades 74

Tableau 5 : Avantages et inconvénients des vaccins vivants atténués 92

Tableau 6 : Avantages et inconvénients des vaccins inactivés 95

Figure11: Origine de la souche T-263.3 ARA-A résistante de *Toxoplasma gondii* 101

Tableau 7: Association de chaque facteur expérimental avec le pourcentage de simulations dans lesquelles l'infection par *Toxoplasma gondii* a été éliminée chez les porcs à l'engrais 107

Tableau 8: Tableau récapitulatif des études d'immunisation contre *Toxoplasma gondii* menées chez le chat 110

LISTE DES ABREVIATIONS

Ac: Anticorps

ADCC: Antibody Dependent Cellular (ou Cell-mediated) Cytotoxicity

ADN: Acide DésoxyriboNucléique

AFIRAC: Association Française d'Information et de Recherche sur l'Animal de Compagnie

Ag: Antigène

ALT : Alanine AminoTransférase

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

AMPc : Adénosine MonoPhosphate cyclique

AQR : Appréciation Quantitative des Risques

Ara-A : Adénine Arabinoside

ARN : Acide RiboNucléique

AST : Aspartate AminoTransférase

BCG *:* Bacille de Calmette et Guérin

CAT-HSTK^{+}: Chloramphenicol Acetyl Transferase – Herpes Simplex virus Thymidine Kinase fusion sequence

CD : Cellule Dendritique

CMH I/II: Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe I/II

CNR : Centre National de Référence

CNRS : Centre National de la Recherche Scientifique

CPA : Cellule Présentatrice d'Antigène

CpG : Séquence de dinucléotide : Cytosine-phosphate diester-Guanine

CTLA4: Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4 (=CD152 ou Cluster of Differentiation 152)

DHFR : DéHydroFolate Réductase

DL : Dose Létale

ELI: Expression Library Immunization

ELISA: Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

FeLV: Feline Leukemia Virus

FHV: HerpesVirus Félin

FIV: Feline Immunodeficiency Virus

GM-CSF: Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor

Gp: Glycoprotéine

GTP: Guanosine TriPhosphate

HD : Hôte Définitif

HI: Hôte Intermédiaire

HIV: Human Immunodeficiency Virus

HSP: Heat Shock Proteins

IELs: Lymphocytes Intra-Epithéliaux

IFA : Incomplete Freund's Adjuvant

IFI : Immunofluorescence Indirecte

IFN γ: Interféron gamma

Ig : Immunoglobuline

IL : InterLeukine

iNOs: Oxyde Nitrique synthétase inductible

INRA : Institut National de la Recherche Agronomique

IRG: Immunity-Related GTPase

ISCOM: Immuno Stimulating COMpound

kD: KiloDalton

kGy: KiloGray

KO: Knock out

LB: Lymphocyte B

LBA: Liquide Broncho-Alvéolaire

LCR : Liquide Céphalo-Rachidien

LES : Lupus Erythémateux disséminé

LT: Lymphocyte T

LTh: Lymphocyte T helper

MAT: Test d'Agglutination directe Modifiée

MLNDCs: Mesenteric Lymph Node Dendritic Cells

MO: Microscope Optique

MP: MacroPhage

MVA : Modified Vaccinia Ankara

NF-kB: Nuclear Factor kappa B

NK: Natural Killer

NO: Monoxyde d'azote

ODN: Oligonucléotide

PAS: Periodic Acid Schiff

PBS: Phosphate Buffered Saline

PCR : Polymérase Chain Reaction

PEF : Penetration Enhancing Factor= facteur favorisant la pénétration

Pg: Prostaglandine

PIF : Péritonite Infectieuse Féline

PM : Poids Moléculaire

PV : Parasitophorous Vacuole

PVM : Parasitophorous Vacuole Membrane

PRV : Pseudorabies Virus

SIDA : Syndrome d'Immunodéficience Acquise

SNC: Système Nerveux Central

SPDCs: SPleen Dendritic Cells

SPF: Specific Pathogen Free

TcR: T cell Receptor

TK: Thymidine Kinase

TLR9: Toll-like receptor 9

TNF α: Tumor Necrosis Factor alpha

UI: Unité Internationale

VIH: Virus de l'Immunodéficience Humaine

WHO: World Health Organization

LEXIQUE PARASITOLOGIQUE

APICOMPLEXA: Phylum de protozoaires intracellulaires dépourvus d'organites locomoteurs, se déplaçant par glissement favorisé par l'actine. Le germe infectieux possède un complexe apical caractéristique.

APICOPLASTE: Organite de type plaste situé à la partie apicale du noyau des protozoaires apicomplexa. D'origine endosymbiosique, l'apicoplaste porte son propre génome, et est l'homologue des chloroplastes de végétaux et d'algues. Il conditionne plusieurs voies métaboliques des parasites qui le possèdent.

BRADYSCHIZOGONIE: Désigne la multiplication asexuée lente des protozoaires intracellulaires en localisations exentérales chez leurs hôtes intermédiaires. Ce processus fait suite aux tachyschizogonies. Il assure la formation de nombreux bradyzoïtes, contenus dans les kystes. La bradyschizogonie caractérise la phase chronique, non pathogène, du processus infectieux ; elle est liée à une réaction immunitaire de l'hôte. En cas de rupture de l'immunité, la bradyschizogonie fait place à une nouvelle tachyschizogonie.

BRADYZOÏTE (=CYSTOZOÏTE): Elément du cycle des coccidies, contenu, chez l'hôte intermédiaire, dans un kyste en localisation exentérale. Les bradyzoïtes se présentent en amas, formés suite à une réaction immunitaire entraînant le ralentissement de la multiplication du parasite.

COCCIDIOSE: Terme désignant, au sens strict, des protozooses des cellules épithéliales, généralement intestinales, chez l'hôte unique (cycle monoxène) ou chez un hôte définitif (cycle dixène).

COCCIDIOSE TOXOPLASMIQUE: Désigne la protozoose induite par *Toxoplasma gondii* dans les entérocytes de l'hôte définitif (félidé) à l'issue de laquelle des ookystes immatures sont évacués dans les fèces (après reproduction sexuée du parasite). Pour désigner la protozoose correspondante chez l'hôte intermédiaire, on utilise le terme de « Toxoplasmose ».

COMPLEXE APICAL: Structure antérieure du germe infectieux des protozoaires parasites du phylum des Apicomplexa, jouant un rôle très important dans la pénétration dans la cellule hôte. Il montre, en microscopie électronique, diverses formations : conoïde (inconstant), microtubules, anneau polaire antérieur, rhoptries, micronèmes, micropore.

CONOÏDE: Formation tronc-conique, constituée d'éléments fibrillaires en spirale, située à l'extrémité antérieure des germes infectieux des apicomplexa. Le conoïde appartient au complexe apical des parasites du phylum des Apicomplexa.

CYCLE DIXENE (HETEROXENE): Le cycle évolutif comporte deux hôtes : l'hôte définitif et un hôte intermédiaire.

CYCLE EVOLUTIF: Processus biologique suivi par un parasite depuis sa naissance jusqu'à sa maturité et au cours duquel il passe par plusieurs états morphologiques et biologiques. Le cycle évolutif s'accomplit chez un ou plusieurs hôtes selon différentes modalités.

CYCLE MONOXENE: Absence d'hôte intermédiaire, le cycle évolutif ne comprend qu'un seul hôte. La transmission à l'hôte définitif se fait à partir de l'environnement.

CYCLE POLYXENE (HETEROXENE): Présence de plusieurs hôtes intermédiaires dans le cycle évolutif.

ENDODYOGENIE (=forme d'ENDOGENIE): Multiplication asexuée des tachyzoïtes et bradyzoïtes dans les cellules des hôtes intermédiaires. C'est un bourgeonnement interne du noyau du parasite, qui aboutit à la formation de deux noyaux fils puis la cellule scinde son cytoplasme pour donner deux cellules filles.

GAMETOGONIE (=GAMOGONIE): Phase de reproduction sexuée dans le cycle de certains protozoaires (sporozoaires). Elle permet la transformation des schizozoïtes en gamétocytes mâles et femelles.

KYSTES TISSULAIRES à BRADYZOITES: Formations constituées par la cellule hôte au sein de laquelle les parasites se multiplient abondamment de façon lente. Les kystes constituent des formes de résistance et de dissémination du parasite car ils sont capables d'infecter un nouvel hôte.

MACROGAMETOCYTE: Schizozoïte subissant la méiose pour former le gamète femelle mature (ou MACROGAMETE) pendant la phase de reproduction sexuée du cycle de certains sporozoaires.

MICROGAMETOCYTE: Schizozoïte subissant la méiose pour former le gamète mâle mature (ou MICROGAMETE) pendant la phase de reproduction sexuée du cycle de certains sporozoaires.

MICRONEMES: Organelles sécrétoires en forme de tube spiralé possédés par les protozoaires du phylum des Apicomplexa. Ils ont un rôle dans la mobilité du parasite et la pénétration cellulaire.

OOCYSTES (=OOKYSTES): Formes exogènes du parasite (formes de résistance et de dissémination). Il s'agit des zygotes enkystés issus de la reproduction sexuée.

PERIODE PATENTE: Durée d'une maladie ou d'une affection parasitaire, appréciée par le temps pendant lequel on peut mettre en évidence des éléments de dissémination du parasite chez un individu. Dans le cas de la toxoplasmose, il s'agit de la période pendant laquelle l'animal infecté excrète des oocystes dans le milieu extérieur.

PERIODE PREPATENTE: Temps écoulé entre le moment de l'infection ou de l'infestation d'un individu et la possibilité de mise en évidence du parasite ou de ses éléments de dissémination. Dans le cas de la toxoplasmose, il s'agit du temps entre l'infestation et la production des premiers oocystes par le félin hôte définitif.

PHORESIE: Etat dans lequel un parasite est transporté par un autre individu qui n'est pas son hôte, mais qui est nécessaire à la découverte de l'hôte normal ; cet individu est un « hôte phorétique » ou « hôte de transport ».

PSEUDOKYSTES: Formations intracellulaires à localisation exentérale de certaines coccidies, qui résultent de la multiplication rapide du parasite sous forme tachyzoïtique au sein d'une vacuole parasitophore. Si l'individu parasité est capable d'une réaction immunitaire, la multiplication des tachyzoïtes se ralentit, le pseudokyste devient un kyste à bradyzoïtes et le processus parasitaire se stabilise, mais avec risque de réversibilité en cas de rupture d'immunité et retour à l'état pseudokystique actif.

RHOPTRIE: Organelle sécrétoire spécialisé des protozoaires du phylum des Apicomplexa. C'est une formation osmiophile en forme de massue fixée à la base du conoïde au niveau de l'extrémité antérieure des germes infectieux. Les rhoptries appartiennent au complexe apical et interviennent ainsi dans la pénétration du parasite dans la cellule hôte.

SCHIZOGONIE (=MEROGONIE): Processus de multiplication asexuée, par divisions multiples et successives du noyau puis du cytoplasme, aboutissant à la formation d'un stade polynucléé (schizonte immature) puis cloisonné en cellules appelées schizozoïtes (schizontes mûrs).

SCHIZONTE (=MERONTE): Stade évolutif de la reproduction asexuée des protozoaires, succédant au stade de trophozoïte, produit à l'issue de la schizogonie et donnant naissance aux schizozoïtes.

SCHIZOZOÏTE (= MEROZOÏTE): Stade évolutif des protozoaires, succédant au stade schizonte. Il s'agit du seul stade subissant la gamétogonie, c'est-à-dire la reproduction sexuée du parasite.

SPOROCYSTE: Chez les sporozoaires apicomplexa, le sporocyste est un sac clos, contenu dans les ookystes sporulés et contenant un nombre variable de sporozoïtes, infectants pour les hôtes vertébrés des parasites.

SPORONTE: Cellule diploïde renfermée initialement par l'ookyste après reproduction sexuée et avant sporogonie.

SPOROZOÏTE: Forme parasitaire directement infectante pour les hôtes intermédiaires, issue de la division de l'ookyste par sporogonie. Chacun des deux sporocystes contenus dans l'oocyste mature renferme 4 sporozoïtes chez *Toxoplasma gondii*.

SPORULATION (=SPOROGONIE): Maturation des ookystes dans le milieu extérieur, aboutissant à la formation des sporozoïtes, stades infectants du parasite (par division du noyau du zygote). La durée de la sporulation varie de 2 à 15 jours ou plus suivant les conditions extérieures (température notamment) pour *Toxoplasma gondii*.

TACHYSCHIZOGONIE: Multiplication rapide des sporozoïtes, puis des tachyzoïtes dans les pseudokystes.

TACHYZOÏTE (=TROPHOZOÏTE): Elément contenu dans un pseudokyste coccidien en localisation exentérale, suite à une multiplication rapide des parasites. Le tachyzoïte de *Toxoplasma gondii* a une forme de croissant de 2-4 µm × 4-8 µm.

VACUOLE PARASITOPHORE: Vacuole formée par une invagination cytoplasmique au sein d'une cellule, faisant suite à un processus d'endocytose actif et enfermant les parasites qui ont pénétré activement dans la cellule.

INTRODUCTION

La toxoplasmose est une infection parasitaire dont l'agent responsable est le protozoaire *Toxoplasma gondii* (parasite intracellulaire obligatoire). Son nom provient de sa morphologie (*toxon*=arc et *plasma*=forme) et de l'espèce chez laquelle il a été découvert, *Ctenodactylus gundi* (« le gondi », rongeur sauvage). Le parasite infecte tous les vertébrés à sang chaud, mammifères, hommes et oiseaux. Le cycle de développement du parasite est particulièrement complexe et l'hôte définitif est systématiquement un félidé (sauvage ou domestique). Il s'agit d'une zoonose qui présente un risque sérieux pour les femmes enceintes séronégatives et les sujets immunodéprimés. Cette parasitose majeure est cosmopolite et on estime qu'un tiers de la population mondiale est infectée par *Toxoplasma gondii*. En Europe, la prévalence sérologique chez les humains varie selon les pays de 8 à plus de 70% (*AFSSA, 2005*). En France, environ 50% de la population adulte est infectée et il semble que 200000 à 300000 nouvelles infections surviennent chaque année dont 2700 cas chez les femmes enceintes (*AFSSA, 2005*). C'est aussi la plus fréquente des maladies congénitales françaises après la trisomie 21 (*Bout D. et al., 1996)*.

Le parasite a été découvert sous sa forme infectieuse dans les tissus de *Ctenodactylus gundi* à l'institut Pasteur de Tunis par Nicolle et Manceaux en 1908 et quasi simultanément au Brésil chez un lapin par Splendore en 1909. Son cycle biologique et son importance en parasitologie humaine sont alors inconnus. Dans les années 1920-1930 apparaissent les premières descriptions de toxoplasmose humaine. Les premiers tests sérologiques ont été mis au point dans les années 1940 mais la compréhension du cycle du parasite et des modes de transmission n'a eu lieu qu'au cours des années 1970 par W.M Hutchison et J.K. Frenkel (séparément). Le chat est alors identifié comme seul hôte définitif, les hôtes intermédiaires étant divers mammifères ou oiseaux, chez lesquels le toxoplasme forme des kystes à bradyzoïtes, infectants pour le chat.

La toxoplasmose a une double importance en santé publique et vétérinaire du fait de la menace de transmission transplacentaire chez les femmes enceintes séronégatives et des pertes économiques provoquées par les avortements chez les espèces de rente. Le chat est au centre du cycle de développement parasitaire puisque les félidés sont les seuls hôtes chez lesquels la reproduction sexuée peut avoir lieu. Mais cela en fait-il l'acteur principal de la transmission à l'homme et aux animaux destinés à la consommation ? La perception du rôle du chat au sein de la toxoplasmose a beaucoup évolué depuis la découverte du parasite, et surtout depuis la compréhension de son cycle évolutif. Au départ, les médecins ont considéré le chat comme principale source de contamination humaine et donc

de toxoplasmose congénitale, ils conseillent alors aux femmes enceintes de se séparer de leur chat. Jusque dans les années 1990, le facteur « chat » va rester au centre des inquiétudes du corps médical. Puis le rôle du chat est relativisé et les facteurs alimentaires de contamination sont mis en avant (consommation de viande crue ou mal cuite, ingestion ou contact avec des fruits, des légumes ou de l'eau souillés). La question de l'intérêt d'une vaccination féline mérite donc réflexion : aurait-elle un réel impact sur la prévalence animale et humaine de l'infection toxoplasmique ?

Un congrès international pour célébrer le centième anniversaire de la découverte de *Toxoplasma* s'est tenu l'année dernière au Brésil, intitulé : « *Toxoplasma*, congrès centenaire : de la découverte à la gestion de la santé publique ». Diverses études y ont été présentées: de la biologie cellulaire basique, au diagnostic et contrôle de l'environnement en passant par l'immunologie, la génomique, les études cliniques et les programmes de lutte pour la maîtrise de la santé publique (*Bahia-oliveira et al., 2009*). *Toxoplasma gondii* est la coccidie la plus étudiée jusqu'alors. En 2000, on recensait déjà plus de 15000 articles de recherche, plus de 500 revues, et de nombreux livres ou chapitres lui étant consacrés (*Tenter A.M. et al., 2000*). Pourtant, de nombreux aspects de sa biologie, de son cycle naturel et de son épidémiologie restent encore peu connus. La diversité génétique de *Toxoplasma gondii* et la distribution géographique des génotypes comptent parmi les découvertes majeures de ces 25 dernières années, les génotypes sud-américains étant différents des européens ou nord-américains (certains continents restant par ailleurs inexplorés). Des avancements considérables ont été faits depuis une vingtaine d'années dans les recherches de biologie cellulaire et moléculaire sur le toxoplasme. Une question centrale reste à investiguer : celle de la possibilité, jamais observée jusqu'à maintenant, d'une reproduction sexuée chez des hôtes non félins, ceci bouleverserait considérablement le protagonisme du chat dans le cycle parasitaire (*Boothroyd J.C., 2009*). Parmi les objectifs de recherche pour le siècle à venir, on trouve les investigations sur les médicaments anti-toxoplasme et également la vaccination animale et humaine (*Boothroyd J.C., 2009*).

Dans cette étude, nous nous intéresserons à ce second objectif, en se concentrant particulièrement sur la vaccination féline. Après une première partie de rappels sur le toxoplasme et ses effets sur les hôtes animaux et humains, nous centrerons notre réflexion sur le rôle du chat dans la transmission de cette parasitose, pour enfin faire le point sur la vaccination féline contre *Toxoplasma gondii*: ses objectifs, ses outils actuels et les perspectives d'avenir.

I. RAPPELS SUR LA TOXOPLASMOSE

A. L'agent pathogène : *Toxoplasma gondii*

1. Classification

1.1. Taxonomie

(*Bussieras J. et Chermette R., 1992*)

Toxoplasma gondii est un protozoaire intracellulaire obligatoire appartenant au Phylum des **Apicomplexa** (présence d'un « complexe apical » caractéristique permettant l'entrée dans les cellules hôtes) et à la classe des **Coccidies,** au même titre qu'*Eimeria, Isospora, Cryptosporidium* ou *Neospora*. Les coccidies provoquent toutes une infestation digestive chez l'hôte définitif, aboutissant à la production d'ookystes libérés dans les fèces.

1.2. Différentes souches

(*Dardé M.L., 2004*), (*Howe D.K. et al., 1995*), (*Euzeby J., 1998*)

Le genre *Toxoplasma* ne contient qu'une seule espèce, *T. gondii*, mais plus de 200 isolats (ou « souches ») ont bénéficié d'analyses génotypiques. On étudie la virulence des souches chez la souris pour définir leur pathogénicité : détermination des DL50 (Dose Létale) et DL100, doses minimales de parasites entraînant la mort de 50% ou de 100% des souris infectées. La capacité à former des kystes est différente suivant les souches et il existe une relation entre la pathogénicité d'une souche et son aptitude à la kystogénèse :

-les souches rapidement kystogènes sont moins pathogènes car les parasites sont contenus dans la paroi kystique (ce qui évite leur dissémination), et se multiplient lentement (bradyschizogonie). Chez la souris, modèle animal, ce sont les souches responsables de toxoplasmose chronique,

-les souches virulentes sont peu kystogènes, leur multiplication est rapide (tachyschizogonie) et elles détruisent leurs cellules-hôtes. Ces souches sont létales pour la souris en moins de 10 jours (4 à 5 jours en moyenne) après inoculation par voie intrapéritonéale, avec production d'ascite contenant de nombreux tachyzoïtes. C'est le cas de la souche RH (isolée en 1941 par Sabin à partir d'un cas d'encéphalite humaine aiguë), une des plus utilisées dans les programmes de recherche sur le toxoplasme.

La majorité (95%) des isolats analysés sont regroupés en 3 génotypes principaux équivalents à des lignées clonales, stables dans le temps et l'espace (types I, II et III). Les différences entre les principaux génotypes d'isolats concernent :

-la virulence pour la souris (une souche est considérée comme virulente pour la souris lorsque la dose létale DL 100 est de 1 tachyzoïte inoculé par voie intrapéritonéale, entraînant la mort de la souris en moins de 10 jours),

-la vitesse de multiplication en culture cellulaire et la possibilité de transformation *in vitro* des tachyzoïtes en bradyzoïtes aboutissant à la formation de kystes,

-les capacités de migration et de transmigration à travers les barrières biologiques.

Il existe également des recombinants des souches I et III ainsi que des souches atypiques, très virulentes, dont la majorité des allèles n'est pas retrouvée chez les 3 types.

-<u>génotype I</u>

Il est très rarement isolé (ne représente que 10% des souches en Europe et aux Etats-Unis, principalement isolé chez l'homme). C'est un génotype très virulent pour la souris. Par exemple, la souche RH a une DL100 de 1 tachyzoïte chez la souris.

Les tachyzoïtes se multiplient rapidement in vitro, ils se transforment peu en bradyzoïtes et en conséquence, peu de kystes sont formés (ces souches peu kystogènes sont peu infectantes pour le chat). Leur capacité de migration et de transmigration à travers les barrières biologiques *ex vivo* est supérieure à celle des types II et III.

Chez la souris, les souches de génotype I entraînent la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (IFN-γ) en excès.

Lors de toxoplasmose humaine causée par ces souches, les atteintes congénitales sont souvent sévères. Il est possible de les isoler à partir de toxoplasmoses de réactivation au cours des états d'immunodéficience.

-<u>génotype II</u> (exemples : souches ME49 et 76K)

C'est le génotype le plus fréquent isolé chez l'homme (80% des souches humaines en Europe et aux Etats-Unis), le mouton, le porc... Il est non virulent pour la souris (DL $100 \geq 10^3$ tachyzoïtes), mais ces souches sont kystogènes donc infectantes pour le chat et génératrices d'ookystes.

Chez la souris, la sécrétion d'IFN- γ est contrôlée et protectrice, il y a par ailleurs induction précoce de la sécrétion d'IL-12 par les macrophages.

Lors de toxoplasmose humaine :

-les atteintes congénitales peuvent être asymptomatiques à mortelles,

-des réactivations sont possibles au cours des états immunodéficients (ce sont les souches prédominantes chez les sidéens),

-chez le patient immunocompétent, on observe des formes lymphadénopathiques et des formes asymptomatiques.

-<u>génotype III</u> (exemple : souche VEG)
Il est plus rare (génotype surtout confiné à l'animal).Sa virulence pour la souris est intermédiaire.
Concernant la toxoplasmose humaine, les atteintes congénitales sont possibles mais peu fréquentes.

-<u>génotypes recombinants ou avec allèles atypiques</u> (*Ajzenberg D.et al., 2004*)
Ils sont plus souvent isolés dans des circonstances épidémiologiques particulières (animaux, biotopes sauvages) et sont plus virulents chez la souris que le type II.
Lors d'infection chez l'homme, on peut observer des atteintes sévères disséminées ou oculaires chez des sujets immunocompétents (*Grigg M.E. et al., 2001*).

Les différences de virulence constatées chez la souris ne sont pas transposables à d'autres animaux, ceci témoigne du rôle majeur de la réponse de l'hôte à l'infection.
Globalement, les souches avirulentes ou de virulence intermédiaire (génotypes II et III) sont kystogènes et aboutissent à la formation de kystes à bradyzoïtes sans entraîner de symptômes. Elles peuvent subir une reproduction sexuée chez le chat, et présentent des variations génétiques (par fusion de gamètes de différentes origines), leur descendance est donc hétérogène.
A contrario, les souches virulentes infectent rarement le chat car elles sont très peu kystogènes, leur multiplication est donc principalement asexuée et leur ADN homogène (les descendants sont des clones identiques).
Tous les génotypes semblent capables d'infecter l'homme, mais on observe une large prédominance du génotype II en Europe, ce génotype étant d'ailleurs associé à la majorité des cas de toxoplasmose congénitale (pratiquement 100%, *Costa J.M. et al., 1997*) et de toxoplasmose du patient immunodéprimé (75% des cas, *Honore S. et al., 2000*).

2. Morphologie et résistance des différentes formes évolutives

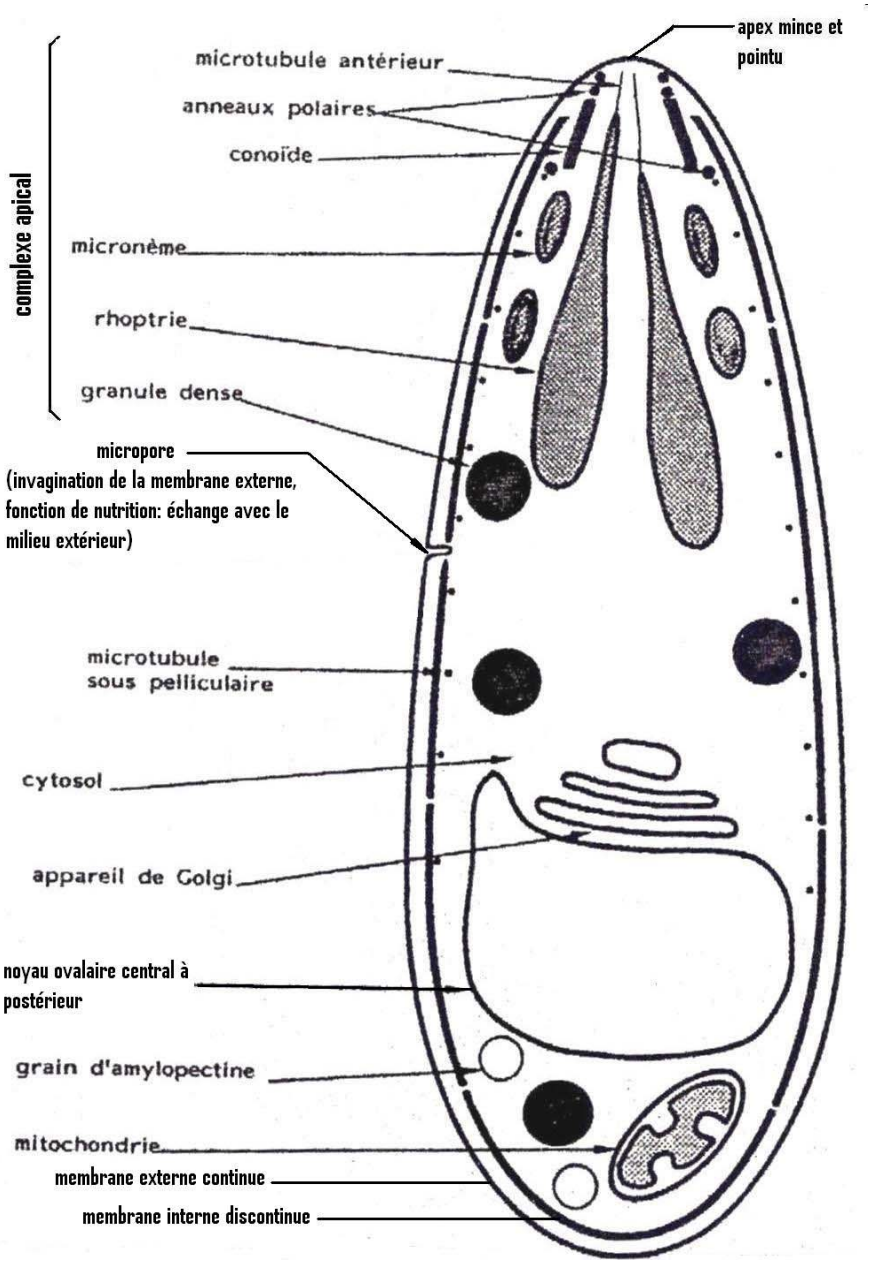
(*Dubey J.P. et Beattie C.P., 1988*)

2.1. Les formes infectieuses chez l'hôte (formes isolées)

Il s'agit des tachyzoïtes, bradyzoïtes et schizozoïtes (=mérozoïtes) selon la localisation, la fonction et le devenir de la forme parasitaire.
La structure générale du parasite reste globalement la même.

▪ Le **stade tachyzoïte** (ou **trophozoïte**) (*figure 1*) est la forme libre proliférative infectieuse chez l'hôte intermédiaire (HI), on peut retrouver cette forme également chez le fœtus. Il se reproduit rapidement par un processus de multiplication asexuée (endodyogénie) chez l'HI (c'est une forme de multiplication rapide du parasite).

Figure 1: Schéma d'un tachyzoïte de Toxoplasma gondii (d'après Fortier B.et al., 1993).



Le tachyzoïte a une forme de croissant de 2-4 µm × 4-8 µm. Le complexe apical permet la pénétration du parasite dans la cellule hôte. Les rhoptries interviennent dans la sécrétion d'enzymes protéolytiques, favorisant cette pénétration.

▪ Le stade **bradyzoïte**, chez l'HI, est contenu dans des kystes intracellulaires. Les tachyzoïtes et les bradyzoïtes sont morphologiquement très semblables, mais le noyau des bradyzoïtes occupe une position excentrique, tandis que celui des tachyzoïtes est situé au centre de la cellule. Les bradyzoïtes ont un nombre plus élevé de micronèmes et de granules d'amylopectine, par contre leurs rhoptries sont peu nombreuses.

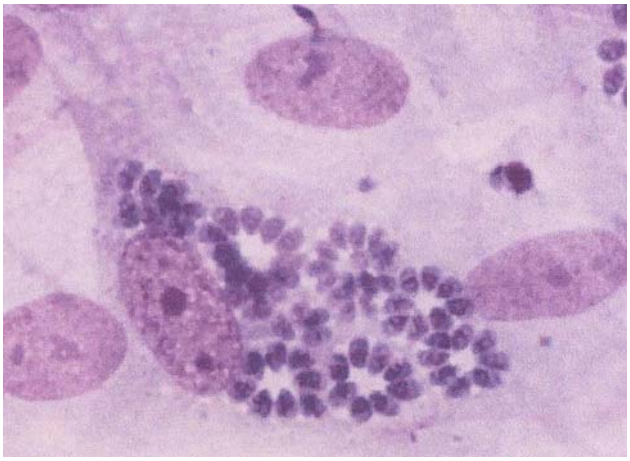
A la différence des formes de reproduction sexuée spécifiquement observables dans les entérocytes, les bradyzoïtes et les tachyzoïtes n'ont aucune spécificité cellulaire : on peut les observer dans les cellules du système des phagocytes mononuclées (monocytes, histiocytes, macrophages), mais aussi dans les cellules épithéliales, les fibroblastes, les hépatocytes, les neurones, etc. Par contre, ils ne peuvent infecter les globules rouges matures et les ostéoblastes (les précurseurs nucléés des globules rouges des mammifères peuvent être parasités, *Werk R. et Bommer W., 1978*). Le plus souvent, les toxoplasmes sont situés dans le cytoplasme cellulaire, au sein d'une **vacuole parasitophore** (cas des pseudokystes), mais parfois aussi dans le noyau.

▪ Le stade **schizozoïte** (ou **mérozoïte**), chez l'hôte définitif (HD), est le seul stade capable de reproduction sexuée.

2.2. Pseudokystes et kystes (formes groupées)

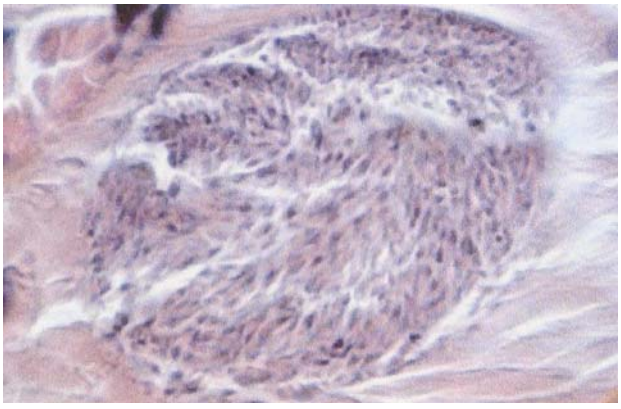
▪ Les **pseudokystes** sont des formations intracellulaires (15-30 µm) qui résultent de la multiplication rapide du parasite sous forme tachyzoïtique. Les tachyzoïtes (jusqu'à deux cents par pseudokyste) sont situés dans une vacuole parasitophore (= **phagosome**) entourée de nombreuses mitochondries intervenant dans leur processus de multiplication. La cellule-hôte infectée n'est pas déformée, elle présente un noyau à contours nets (*illustration 1*). Leur durée de vie est courte (la vacuole puis la cellule hôte éclatent suite à la multiplication parasitaire), on les observe au cours de la phase aiguë de l'infection. Chez un hôte immunocompétent, les pseudokystes se transforment en kyste sous l'action de la réponse immunitaire.

Illustration 1 : Tachyzoïtes (souche RH) formant des pseudokystes dans une cellule infectée (fibroblaste MRC5) (× 400) (source F. Derouin) (AFSSA, 2005).



▪ Les **kystes** (60-100 µm) sont des formations intracellulaires contenant des bradyzoïtes, forme quiescente du parasite, à multiplication lente (jusqu'à plusieurs milliers dans un kyste). Ils occupent la quasi-totalité de la cellule hôte qui est alors déformée, avec un noyau aplati en périphérie, plaqué contre la paroi (*illustration 2*). Cette paroi très fine est bi-lamellaire, formée par le plasmalemme de la cellule-hôte doublé d'un matériel granuleux comportant une composante parasitaire. On peut les retrouver dans tous les tissus mais surtout dans les tissus musculaires (muscles lisses, striés squelettiques et myocarde), intraoculaires et nerveux (notamment dans les astrocytes) (*Euzeby J., 1998*). Leur durée de vie peut être très longue (certains peuvent persister jusqu'à la mort de l'hôte).

Illustration 2 : Kyste à bradyzoïtes dans du tissu musculaire (MO : Microscope Optique× 400) (source M.L. Dardé) (AFSSA, 2005).



Le passage de la forme pseudokystique à la forme kystique est la conséquence de l'acquisition par l'hôte d'un état d'immunité, mais aussi de facteurs génétiques hôte-dépendants. L'IFN γ, en inhibant la multiplication des tachyzoïtes, joue un rôle essentiel dans la genèse de l'immunité.

L'oxyde nitreux (NO) intervient également, par inhibition de l'activité mitochondriale nécessaire à la prolifération des tachyzoïtes. Le phénomène d'enkystement des toxoplasmes fait aussi intervenir une protéine de choc thermique, spécifique des bradyzoïtes. Chez la plupart des animaux, les kystes se forment au cours de la première semaine suivant l'infection (*Euzeby J., 1998*). Ils peuvent reprendre une multiplication tachyzoïtique si la réponse immune de l'hôte devient insuffisante : il y a réactivation et on sort de la phase de toxoplasmose latente ou chronique.

2.3. Les ookystes (formes exogènes) (10-13 µm × 12-15µm)

Ce sont les zygotes enkystés issus de la reproduction sexuée du parasite.
Après la fécondation, ils sont immatures, diploïdes, avec une double paroi (endokyste + ectokyste) lisse et épaisse (0,5 µm). Ils contiennent un unique **sporonte** (*figure 2*).
Après sporulation dans des conditions environnementales particulières, les ookystes deviennent matures (donc infectieux) : ils contiennent alors deux **sporocystes** (6-8 µm × 9-12µm), abritant chacun quatre **sporozoïtes** (2 × 6-8µm), éléments infectieux, peu différents en microscopie optique et électronique des autres stades infectants (*figure 3*).

Figure 2: Ookystes immatures (Euzeby J., 1993).

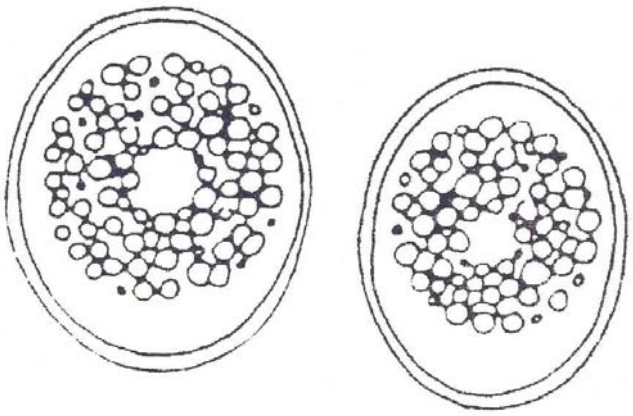
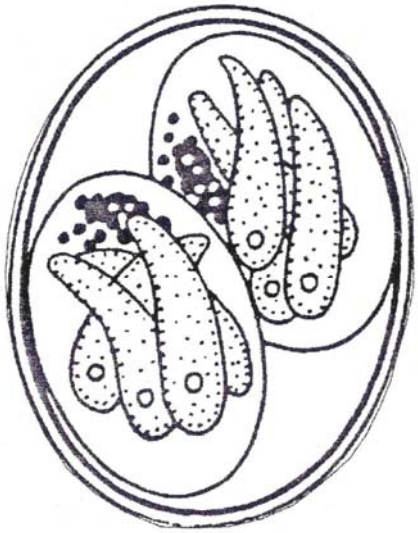


Figure 3: Ookyste sporulé : deux sporocystes renfermant chacun quatre sporozoïtes

(Euzeby J., 1993).



2.4. Résistance des différentes formes de Toxoplasma gondii

(*Voir Annexe 1*)

▪Les pseudokystes et les tachyzoïtes qui les constituent sont des formes de multiplication du parasite, fragiles, à durée de vie courte et présentes pendant la phase aiguë de l'infection seulement. Leur ingestion est rarement contaminante car ceux-ci sont sensibles aux sucs gastriques (*Euzeby J., 1998*). Ils peuvent par contre survivre à 4°C dans du lait pendant au moins une semaine (*Zardi O. et al., 1979*) et sont dans ces conditions parfois source d'infection.

▪Les kystes constituent une forme de résistance du parasite dans l'organisme hôte, leur durée de vie est longue et on les observe lors de la phase chronique de l'infection. Ils assurent la dissémination du parasite car leur ingestion permet l'infection de nouveaux hôtes. Ils peuvent survivre plusieurs jours à température ambiante et plusieurs mois à 4°C mais sont thermosensibles : Dubey (*Dubey J.P. et al., 1990*) estime qu'il faut atteindre une température de 67°C au cœur de la viande pour obtenir une inactivation totale des kystes.

▪Enfin, les ookystes représentent une forme de résistance et de dissémination du parasite dans le milieu extérieur (*voir Annexe 2*), dans lequel ils peuvent rester infectieux pendant 18 mois à l'abri du soleil et pour des températures moyennes d'environ 20°C (*Dubey J.P., 1998*). Ils sont sensibles à la putréfaction et aux conditions anaérobies, de ce fait, les antiseptiques utilisés pour assainir le milieu

augmenteraient paradoxalement le pouvoir infectant des ookystes toxoplasmiques en détruisant les germes de putréfaction et de fermentation (*Euzeby J., 1998*).

Les trois formes parasitaires sont sensibles à la chaleur, et donc à la cuisson. Cette information est primordiale dans les mesures de prévention à appliquer contre l'infection toxoplasmique. Parmi les autres conditions pouvant être utilisées dans le traitement des aliments, seule l'ionisation à une dose minimale de 0,5 kGy a été recommandée. Les autres modes de traitement (micro-onde, salaison, fumaison) n'ont pas une efficacité certaine (*AFSSA , 2005*).

B. Caractères biologiques et cycle de développement parasitaire

1. Caractères biologiques

1.1. Pénétration cellulaire par endocytose

Les formes libres du parasite peuvent réaliser des mouvements de rotation, de glissement, et d'ondulation des parois. Ceci leur permet de pénétrer dans les cellules hôtes. La pénétration intracellulaire des sporozoïtes, bradyzoïtes et tachyzoïtes se fait par endocytose.

Déroulement de l'endocytose :

-fixation du pôle apical du toxoplasme en un point de la cellule hôte déterminé par l'affinité de certaines protéines de surface (glycoprotéine gp30 = SAG1, SAG 3, laminine et ses récepteurs : intégrines, lectines et glycoprotéines de la membrane cellulaire). Le rôle principal dans la fixation du parasite à la cellule hôte est dévolu à la glycoprotéine gp30.

-pénétration active du parasite : protrusion du conoïde, exocytose des micronèmes et des rhoptries qui sécrètent de la myosine (protéine contractile) propulsant le parasite dans la cellule hôte et intervention du PEF (*Penetration Enhancing Factor,* antigène parasitaire cytoplasmique) élaboré par les rhoptries, facilitant cette pénétration.

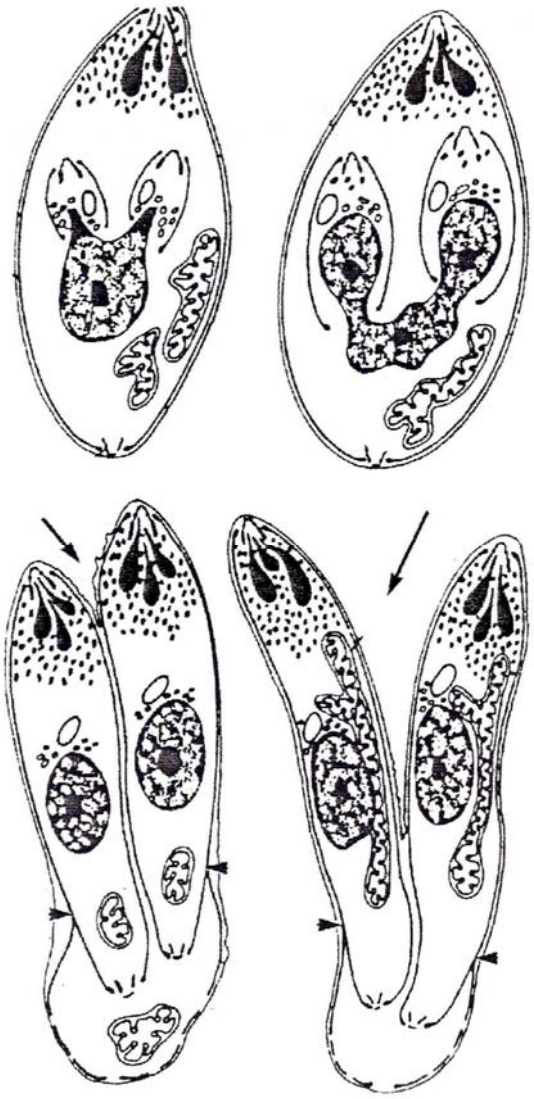
Au moment de l'endocytose, les tachyzoïtes abandonnent l'antigène de surface gp30, qui passe dans la circulation.

Après cette pénétration très rapide (15 à 40 secondes), le parasite est abrité par une vacuole parasitophore limitée par une membrane qui s'accroit progressivement grâce à la sécrétion des granules denses parasitaires (*Garcia J.L., 2009*). Les tachyzoïtes se multiplient toutes les 5 à 10 heures selon les souches, puis leur sortie hors de la vacuole et de la cellule fait aussi intervenir un phénomène actif.

1.2. Multiplication asexuée de T. gondii

Chez les hôtes intermédiaires, les bradyzoïtes et tachyzoïtes se multiplient dans la cellule hôte par **endodyogénie** (ou endogénie) : c'est un bourgeonnement interne du noyau du parasite, qui aboutit à la formation de deux noyaux fils puis la cellule scinde son cytoplasme pour donner deux cellules filles (*figure 4*).

Figure 4: Multiplication endodyogénique de Toxoplasma gondii (Euzeby J., 1993).



Cette multiplication entraîne rapidement une destruction des cellules parasitées. Une cellule hôte peut produire plus de 200 tachyzoïtes en 2 jours, capables d'infester de nouvelles cellules hôtes (*Fortier B. et Dubremetz J.F., 1993*).

L'endodyogénie se déroule en deux phases successives :
-une phase aiguë de multiplication rapide, très active (tachy-endogénie) aboutissant à la formation de tachyzoïtes au sein des pseudokystes,
-si l'hôte intermédiaire (HI) est immunocompétent, commence alors une phase endogénique lente : il y a multiplication du parasite sous forme de bradyzoïtes dans des kystes. L'infection devient chronique (ou latente car les kystes peuvent être réactivés lors d'immunodépression).

1.3. La reproduction sexuée de T. gondii : cycle intestinal de type coccidien chez le chat (ou « coccidiose toxoplasmique »)

La multiplication sexuée n'a lieu que dans les entérocytes de l'HD, après pénétration d'un bradyzoïte. Trois étapes se succèdent:

▪ **La schizogonie**

Il y a pénétration active des bradyzoïtes dans les entérocytes et transformation en trophozoïtes. Les trophozoïtes se divisent ensuite et forment des schizontes qui donnent naissance à de nombreux schizozoïtes. La cellule hôte est détruite lors de la libération des schizontes.

▪ **La gamétogonie** (transformation en éléments mâles ou femelles)

Certains schizozoïtes se transforment en gamétocytes.
Les microgamétocytes réalisent des divisions nucléaires et donnent 12 à 32 microgamètes (= gamètes mâles).
Les macrogamétocytes ne réalisent pas de division nucléaire, ils donnent les macrogamètes (= gamètes femelles).
Lorsque les cellules hôtes des microgamétocytes éclatent, les microgamètes rejoignent les macrogamètes, il y a alors fécondation et formation d'un ookyste immature qui est éliminé dans le milieu extérieur, 15 à 20 jours post-infection.

▪ **La sporulation**

Si les conditions environnementales sont favorables, l'ookyste immature sporule. La durée de la sporulation varie de 2 jours à 15 jours ou plus selon la température (24 à 48h à 25°C en milieu humide et aéré, *Dubey J.P. et al., 1970b*).
Trois facteurs principaux importent au bon déroulement de la sporulation : (*Euzeby J., 1998*)
-la température : la température optimale étant comprise entre 28 et 30°C,
-l'humidité : l'hygrométrie optimale est de 80%,
-l'oxygénation.

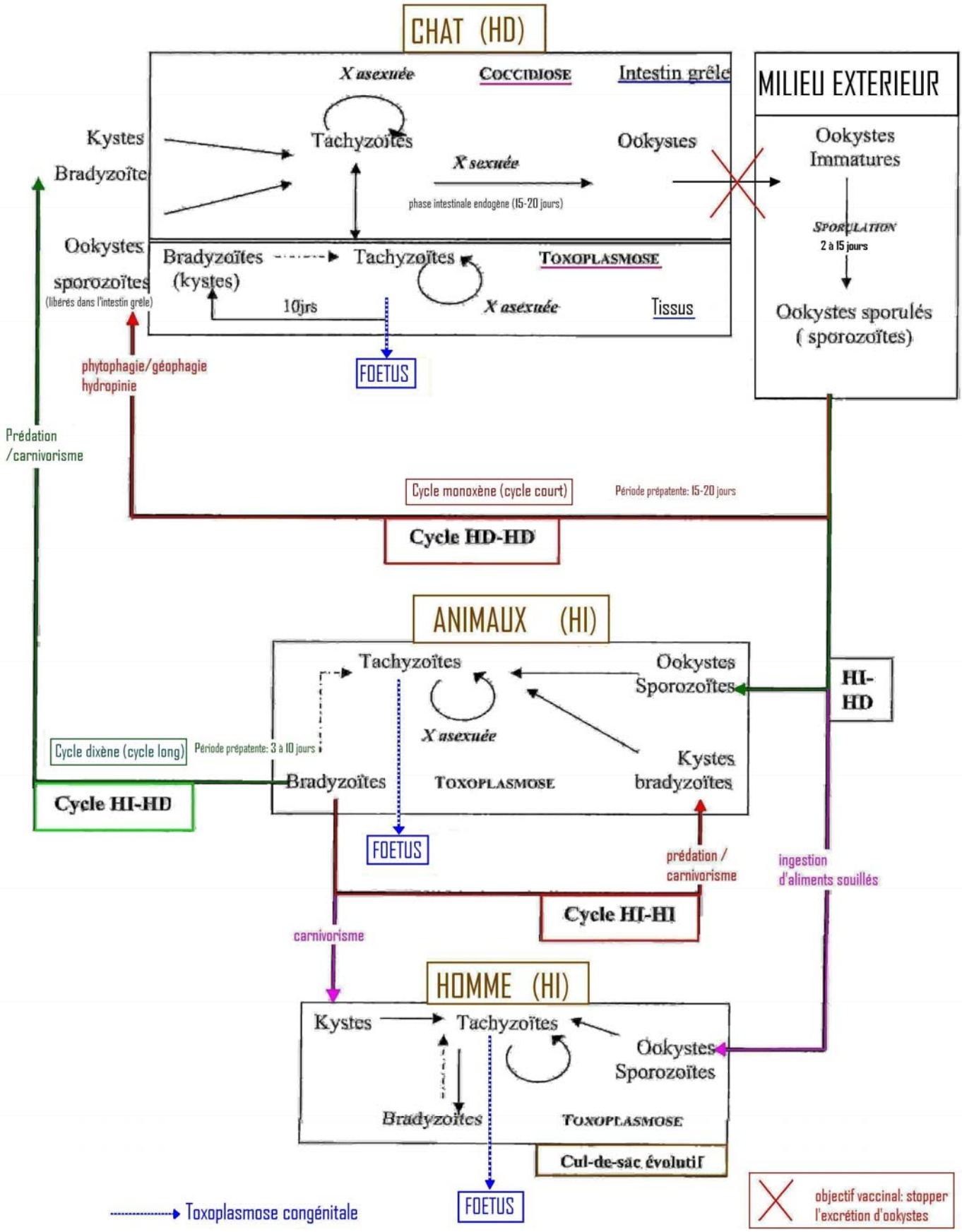
Ce processus aboutit à la formation de deux sporocystes renfermant chacun 4 sporozoïtes, infectants pour les hôtes intermédiaires.

2. Le cycle de développement du toxoplasme

Le cycle évolutif du toxoplasme est complexe (*figure 5*). Il est facultativement dixène, peut se faire uniquement chez le chat : cycle monoxène, ou même entre hôtes intermédiaires. Les hôtes intermédiaires possibles sont extrêmement variés (tous les animaux à sang chaud), et sont parfois très nombreux à intervenir dans un cycle. Le toxoplasme est un des parasites les plus polyxènes connu à ce jour.

L'infection se fait soit par ingestion d'ookystes présents dans le milieu extérieur soit par ingestion de kystes présents dans les tissus des hôtes intermédiaires. Une transmission verticale est possible lors de primo-infection de femelles gestantes, le fœtus peut alors développer une toxoplasmose congénitale.

Figure 5: Cycle évolutif de Toxoplasma gondii (d'après Loriaux M.J., 2008)



2.1. Les différents types de cycles possibles

▪ **Cycle HD-HD**

Dans ce cas, le cycle se déroule uniquement chez le chat, HD. On parle également de **cycle monoxène** (ou « **cycle court** »).
Le chat se contamine par ingestion de terre (géophagie), d'eau (hydropinie) ou de végétaux souillés (phytophagie) par des ookystes sporulés. Dans l'intestin grêle, des sporozoïtes sont libérés par les ookystes. Ils ne peuvent pas envahir directement les entérocytes (seuls les bradyzoïtes le peuvent). Ils traversent donc la muqueuse intestinale et sont distribués par voie sanguine ou lymphatique dans les divers tissus de l'organisme.
Suit une période de multiplication rapide des sporozoïtes (tachyschizogonie) qui aboutit à la formation de tachyzoïtes dans des pseudokystes puis une période de multiplication plus lente (bradyschizogonie) avec formation de bradyzoïtes dans des kystes. Les bradyzoïtes issus de ces kystes pénètrent dans les entérocytes et le chat développe alors une coccidiose toxoplasmique : il y a schizogonie, gamétogonie, fécondation puis évacuation d'ookystes immatures avec les fèces. Ainsi, lors de cycle monoxène, un stade « toxoplasmique » précède le stade « coccidiose » de l'infection féline. La période prépatente (c'est-à-dire le temps entre l'infestation et la production des premiers œufs) est de **15 à 20 jours** (*Euzeby J., 1998*).

▪ **Cycle HI-HD**

Il s'agit du cycle de base faisant intervenir un HD: le chat, et un HI quel qu'il soit. On peut parler de **cycle dixène** (ou **« cycle long »**).
Le chat s'infecte par ingestion de kystes formés chez un HI, ce qui implique donc le carnivorisme. Le chat développe alors une coccidiose toxoplasmique (phase endogène) à l'issue de laquelle des ookystes immatures sont évacués dans les fèces. Il y a sporulation (phase exogène) si les conditions extérieures sont favorables (**48h à 5 jours** en moyenne). Les ookystes sporulés, très résistants dans le milieu extérieur sont alors infectants pour les hôtes intermédiaires. La période prépatente est ici de **3 à 10 jours** (*Davis S.W. et al., 1995*).

L'HI se contaminera ensuite par ingestion d'aliments souillés par des ookystes sporulés. Il développe une toxoplasmose au sens strict : les sporozoïtes libérés dans l'intestin grêle traversent la muqueuse intestinale et sont véhiculés par voie sanguine et lymphatique par les lymphocytes intraépithéliaux, puis ils envahissent les cellules des divers tissus. Il y a alors multiplication par endodyogénie. Lorsque

l'infection devient chronique, il y a formation de kystes. L'HI porteur de kystes est à son tour source de parasite pour l'HD (le chat) ou pour un autre HI et le cycle se poursuit.

Dans les deux types de cycles précédemment décris, le chat, HD, rejette des ookystes dans l'environnnemnent, source de contamination de tout hôte intermédiaire potentiel, y compris l'homme. C'est à ce niveau qu'un vaccin félin devra agir, le but étant de supprimer la source initiale du parasite afin de diminuer la charge parasitaire dans le milieu.

▪ **Cycle HI-HI**

La possibilité de transmission du parasite par carnivorisme entre hôtes intermédiaires par un processus de multiplication asexuée est une des particularités du toxoplasme au sein des coccidies.
Le cycle se déroule sans intervention du chat et donc sans reproduction sexuée. On parle d'une évolution de type auto-hétéroxène : si un HI ingère un autre HI porteur de kystes, les bradyzoïtes libérés gagnent une localisation exentérale, se multiplient dans l'organisme sous forme de tachyzoïtes qui forment des pseudokystes. Ces pseudokystes se transforment en kystes à bradyzoïtes, à nouveau infectants pour d'autres HI.
Les carnivores non félidés comme le chien ou l'homme constituent donc des culs-de-sac épidémiologiques car ils ne sont pas ingérés par d'autres carnivores.

2.2. Les sources de parasites

▪ **Les hôtes intermédiaires, porteurs de kystes**

Tous les vertébrés homéothermes sont des hôtes intermédiaires possibles du parasite.

**Les mammifères domestiques*

Les espèces herbivores s'infectent soit par ingestion d'une nourriture végétale souillée d'ookystes sporulés, soit par ingestion accidentelle d'hôtes phorétiques (*voir infra)*.
Le mouton, la chèvre et le porc présentent une prévalence élevée d'infection toxoplasmique. Le bœuf et le cheval sont à priori plus rarement infectés et leurs tissus sont moins riches en kystes. Cependant, ces prévalences sont très variables selon les régions, l'âge des animaux, le type d'élevage…et les réels taux d'infection sont mals connus.
Les tissus infectants sont les muscles : myocarde, diaphragme, langue (*Cook et al., 2000*), les viscères, le système nerveux central, le placenta lors d'avortements dus au toxoplasme (chez les petits ruminants), et éventuellement le lait.

**Autres animaux*

-Les micromammifères (surtout rongeurs et petits carnivores sauvages) jouent un rôle important dans la contamination du chat, et comme réservoirs de la maladie. Selon Lehmann, des séroprévalences comprises entre 20 et 80% ont été observées en fonction de la localisation des animaux prélevés, et notamment de la proximité d'une ferme d'élevage traditionnel de porc (avec les taux les plus élevés pour des petits animaux sauvages capturés dans un rayon de 50 mètres autour d'une porcherie) (*Lehmann T. et al., 2003*).

-Le gibier pourrait jouer un rôle dans la contamination du chien et de l'homme. Dans une étude menée en Europe du Nord chez les cervidés et comprenant un effectif important d'animaux, la séroprévalence observée est de 34% chez le chevreuil et de 7,7% chez le cerf (*Vikoren T. et al., 2004*). Les séroprévalences rapportées en Europe chez les sangliers sont de 15 à 25% selon les études (*AFSSA, 2005*).

-Toutes les espèces d'oiseaux, y compris les oiseaux domestiques (poulets, dindons, pigeons) peuvent être considérées comme des sources de contamination pour leurs prédateurs (dont le chat) (*Dubey J.P., 2002a*). La volaille domestique, en se nourrissant au sol, est très exposée à une contamination par les ookystes. Par contre, l'isolement du parasite à partir d'œufs n'a jamais été rapporté dans des conditions naturelles (*AFSSA, 2005*).

▪ **Les disséminateurs passifs d'ookystes**

Les chats excrètent leurs ookystes sur le sol et c'est au sein des sols meubles et humides qu'a lieu la sporulation. Là, divers animaux (insectes, mollusques et même mammifères), ainsi que les conditions climatiques (eau de pluie…) assurent la dissémination des ookystes.

Chez les « hôtes de transport » (phénomène de « phorésie »), le parasite ne subit aucune évolution, mais seulement une dispersion tel quel. Des insectes carnivores (coléoptères zoophages), coprophages (scarabées, mouche) ou commensaux (blattes, cafards), ainsi que des mollusques terrestres (hélicidés, limacidés) peuvent ainsi être parasités (*Bettiol S.S. et al., 2000 ; Saitoh Y. et al., 1990 ; Wallace G.D., 1973,1972,1971).*

Le chien peut également être un vecteur passif d'ookystes par son comportement coprophage. Une étude à effectivement montré que des ookystes sporulés ingérées par un chien peuvent transiter le long du tube digestif et être retrouvés, toujours infectants dans les fèces du chien (*Lindsay D.S et al., 1997*). De plus, le chien, qui a tendance à se rouler sur le sol, peut transporter des ookystes dans son pelage et les disséminer par contact.

▪ **L'hôte définitif, excréteur d'ookystes**

Seuls les félidés peuvent être excréteurs d'ookystes. Le chat représente donc une source de contamination centrale pour l'homme et les autres animaux.
Lors d'une primo-infection, le chat rejette des ookystes durant toute la période patente de la coccidiose toxoplasmique (de 10 à 15 jours). Il élimine alors des millions d'ookystes qu'il disperse dans l'environnement. A la fin de cette période patente, il n'en est plus disséminateur, sauf à l'occasion d'une réactivation de la toxoplasmose chronique.
Nous étudierons en détail les particularités de l'excrétion d'ookystes chez le chat lors de la deuxième partie.

2.3. Les modes de transmission

▪ **Transmission par voie orale**

**Ingestion d'ookystes sporulés*

Les ookystes sporulés (provenant de fèces de chats) peuvent être présents dans des aliments (végétaux crus mal lavés surtout) ou dans l'eau de boisson. Chez l'homme, c'est une des sources d'infection reconnues.

Concernant le risque d'infection par contact à partir d'ookystes sur le pelage d'un chat excréteur, ce risque est minime car le toilettage les élimine avant sporulation (*Dubey J.P., 1994*). Par contre, il est plus important chez le chien, comme vu précédemment, même s'il reste minime. En effet, l'étude de Lindsay a montré que les ookystes excrétés par un chat ne sporulaient pas lorsqu'ils étaient déposés sur le pelage d'un autre animal (*Lindsay D.S et al., 1997*).

Une probable contamination des océans par des ookystes de *Toxoplasma gondii* a été tenue pour responsable de la forte mortalité des loutres (sentinelles de la transmission du parasite dans les écosystèmes marins) lors d'études menées en Californie (*Conrad et al., 2005*). Une étude plus récente (*Miller M.A. et al., 2008*) a également révélé une forte concentration d'ookystes de *Toxoplasma gondii* chez des bivalves marins, en partie responsables de la contamination des loutres qui consomment ces invertébrés filtreurs. Les mammifères marins sont donc exposés à des infestations par des ookystes, probablement entraînés par les eaux résiduaires, pluviales ou rejetées en mer par certaines stations d'épuration. Les ookystes peuvent survivre et sporuler dans l'eau de mer, c'est ainsi qu'ils entrent dans la chaîne de contamination (*Lindsay D.S. et al., 2003*).

**Ingestion de kystes à bradyzoïtes*

C'est le mode d'infection principal chez le chat, par carnivorisme. Le chat s'infecte en se nourrissant par prédation ou s'il est alimenté avec de la viande ou des abats crus. Les aliments industriels, stérilisés, ne sont pas infectants. Lors de l'ingestion de kystes, le chat contracte alors en 5 à 6 jours une coccidiose toxoplasmique.

Les animaux omnivores, comme le porc, contractent souvent la toxoplasmose en ingérant de petits rongeurs (rats, souris) porteurs de kystes. Dans certaines régions, on a pu établir une correspondance entre le taux d'infection des muridés et celui des porcs (l'évaluation du taux d'infection des rongeurs peut donc avoir un intérêt épidémiologique). (*Dubey J.P.et al., 1986*; *Lehmann T. et al., 2003*).

Tous les animaux de boucherie sont des sources possibles de kystes, l'homme peut donc aussi s'infecter par carnivorisme, en ingérant des viandes infectées crues ou insuffisamment cuites.

**Ingestion de tachyzoïtes*

Le rôle des tachyzoïtes reste anecdotique dans l'infection par ingestion. Il semblerait que le chat puisse s'infecter par ingestion de tachyzoïtes à partir d'une proie en phase aiguë de toxoplasmose (*Bourdeau P., 1993*). Chez l'homme, les tachyzoïtes n'ont été retenus comme source d'infection que dans une observation, à partir de lait de chèvre non pasteurisé (*Skinner L.J. et al., 1990*). Euzeby supposait que le lait renfermait des kystes (*Euzeby J., 1998*) mais depuis, la survie des tachyzoïtes dans le lait de chèvre a été démontrée (*Walsh et al., 1999*).
En revanche, le risque de contamination par le lait de vache est jusqu'à présent considéré comme quasi nul (*AFSSA, 2005*), une seule étude (*Rommel M. et Breuning J., 1967*) rapportant la présence du parasite dans du lait suite à une infection expérimentale des vaches (parasite isolé qu'une fois chez plus de 2000 souris inoculées avec le lait).

▪ **Transmission *in utero***

Au cours de la gestation d'un hôte, un passage transplacentaire du toxoplasme est possible sous forme tachyzoïtique lors de la phase aiguë (au cours des tachyschizogonies). Seule une toxoplasmose primaire ou une réactivation de kystes dormants (immunodépression) peuvent donc être à l'origine d'une toxoplasmose congénitale. Le passage transplacentaire des toxoplasmes, dont le mécanisme exact n'est pas totalement élucidé, ne se réalise pas par voie sanguine mais par voie tissulaire : il y a infection des trophoblastes (*Abbasi M. et al., 2003*) et une nécrose placentaire (confinée aux cotylédons) est généralement observable (*Dubey J.P., 1988*).

La transmission verticale a lieu chez les mammifères ayant une placentation de type épithélio-choriale (brebis, chèvre, vache, porc), endothélio-choriale (chien, chat) ou hémochoriale (rongeurs, homme).

▪ **Autres modalités de transmission**

-Une inoculation par morsure (avec présence de bradyzoïtes dans la salive) a été rapportée (*Dubey J.P., 1986*),
-Lors de greffe d'organes ou tissus infectés (cœur, poumon, moelle osseuse, rein et plus rarement foie), il peut y avoir transmission de la toxoplasmose chez l'homme, d'autant plus que la greffe s'accompagne d'un traitement immunosuppresseur (*AFSSA, 2005 ; Speirs G.E., 1988),*
-La transmission serait aussi possible lors de transfusion de produits sanguins qui contiendraient des tachyzoïtes mais les cas rapportés sont très rares du fait de la brièveté de la parasitémie chez tout sujet récemment infecté *(Beauvais B. et al., 1976 ; Nelson J.C. et al., 1989).*
La loi exige donc une sérologie de la toxoplasmose avant les prélèvements d'organes en vue de transplantations.

C. Les influences de la toxoplasmose en santé vétérinaire et santé publique

1. Impacts en santé vétérinaire

1.1. Réceptivité et sensibilité des animaux hôtes potentiels

Tous les animaux à sang chaud, mammifères et oiseaux, sont réceptifs à la toxoplasmose, mais leur sensibilité est variable selon la dose infectante, le génotype du parasite et surtout l'espèce.

Parmi les carnivores domestiques, le chien est plus sensible que le chat à la toxoplasmose (les symptômes cliniques sont fréquemment neurologiques dans l'espèce canine). Chez le chat, la séroprévalence dépend en grande partie du style de vie (les chats qui sortent sont plus souvent séropositifs).

L'âge (jeunes animaux) ainsi que l'état pathologique de l'animal jouent également sur la réceptivité et la sensibilité de celui-ci à la toxoplasmose. Certains états infectieux concomitants augmentent fortement ces deux paramètres :
- infections virales (FIV, FeLV, PIF chez le chat, maladie de Carré chez le chien, *louping-ill* chez le mouton) (*Euzeby J., 1998*),
- infections parasitaires (hémobartonellose chez le chat, babésiose, leishmaniose, ankylostomose et ehrlichiose chez le chien).
Certains processus tumoraux (lymphosarcome, leucémie) peuvent, par ailleurs, favoriser la survenue d'une toxoplasmose clinique (*Bourdeau P., 1993*).

1.1. Expressions cliniques chez les animaux

En médecine vétérinaire, la toxoplasmose est surtout reconnue comme étant à l'origine d'avortements chez les petits ruminants (brebis et chèvres) et d'uvéite chez le chat. La symptomatologie des mammifères de rente non ovins reste très discrète. Chez les animaux sauvages, les manifestations cliniques sont mal connues.

▪ Chez les carnivores domestiques

**Chat (HD)*

Dans la majorité des cas, l'infection se traduit chez le chat par une coccidiose toxoplasmique asymptomatique ou plus rarement accompagnée de troubles digestifs (diarrhées et vomissements). Des formes aiguës extra-intestinales peuvent toutefois être observées (hyperthermie, adénopathie, broncho-pneumonie, atteintes hépatiques, nerveuses et cardiaques). La transmission congénitale est possible *(Sato K. et al., 1993*) et dans ce cas l'atteinte oculaire prédomine. Nous relaterons plus en détails la clinique de la toxoplasmose féline lors de la deuxième partie.

**Chien*

Comme chez le chat non immun, les manifestations d'une infection acquise chez un chien adulte sont très variées : anorexie, léthargie, lésions hépatiques, pulmonaires, musculaires et nerveuses. Les lésions oculaires sont par contre exceptionnelles dans l'espèce canine. La toxoplasmose congénitale est généralement fulminante, disséminée et fatale (*Dubey J.P., 1985*), seule une sérologie peut permettre de la différencier de la néosporose.

▪ Chez les espèces de rente

Chez les animaux de rente adultes, la toxoplasmose est souvent asymptomatique.

**Mouton et chèvre*

La gravité de la toxoplasmose chez les petits ruminants est liée à la fréquence de la transmission fœtale : la toxoplasmose congénitale serait l'une des principales causes d'avortement chez la brebis et la chèvre (*Duncanson P. et al., 2001*).

**Porc*

Chez le porc, on peut observer des manifestations oculaires (kératite, ulcère cornéen, hypopion) (*Euzeby J., 1998*). La transmission verticale provoque des avortements, des naissances prématurées et des infections congénitales (*Lind P. et al., 2000*).

**Bovins et Cheval*

Les manifestations cliniques ne sont pas identifiables lors d'infestation naturelle et le risque de transmission fœtale semble très faible.

▪ **Dans la faune sauvage et chez les oiseaux**

**Rongeurs et autres mammifères*

Des données d'infections expérimentales chez les rongeurs de laboratoire rapportent des signes pulmonaires ou digestifs en phase aiguë puis une forme chronique asymptomatique ou une altération progressive de l'état général, conduisant à la cachexie associée à des signes nerveux (*Stahl W.et al., 1988*). Le rat semble partiellement résistant. La transmission congénitale est fréquente en laboratoire, mais son taux est peu connu dans les conditions naturelles.

Des mortalités importantes ont été constatées chez des loutres de mer, des lémuriens, des marsupiaux australiens et des primates du nouveau monde (*Dubey J.P. et Odening K., 2001*).

**Oiseaux*

Les oiseaux domestiques ou sauvages sont fréquemment infectés et la toxoplasmose peut être sévère dans certaines espèces (chez le pigeon par exemple) (*Dubey J.P., 2002a*). La volaille est un bon indicateur de la contamination environnementale du fait de son régime alimentaire.

Au final, la toxoplasmose animale présente une clinique peu spécifique, et généralement peu symptomatique (du moins chez les adultes). Ceci en fait une pathologie souvent sous-diagnostiquée en médecine vétérinaire, chez les animaux domestiques, comme sauvages.

L'impact réel de la toxoplasmose en santé vétérinaire est donc principalement économique, du fait des avortements chez les petits ruminants d'élevage.

Par ailleurs, son caractère zoonotique et sa répartition mondiale amène à ne pas négliger l'impact de la toxoplasmose animale en santé humaine. A ce sujet, les préoccupations majeures du corps vétérinaire sont à la fois l'excrétion et la dissémination d'ookystes par l'hôte définitif (le chat) et le portage de kystes dans les viandes d'élevage destinées à la consommation.

2. Impacts en santé publique

2.1 Modes de contamination de l'homme et données épidémiologiques

Les circonstances de contamination de l'homme sont quasiment identiques à celles rencontrées chez l'animal (*figure 6*):

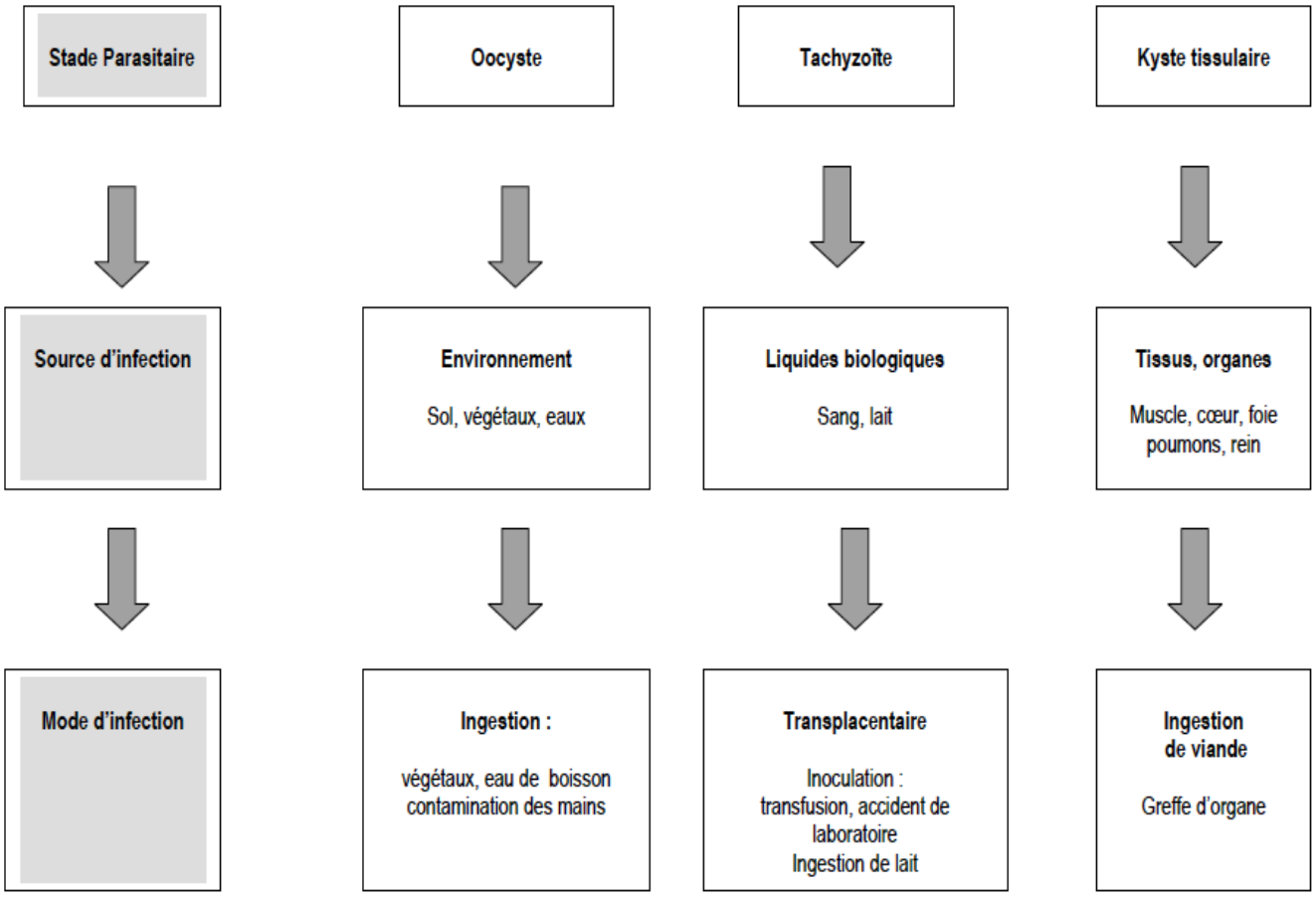
-à partir d'ookystes disséminés dans l'environnement : consommation de végétaux souillés par les ookystes ou contamination d'origine hydrique ou tellurique,

-à partir des kystes tissulaires présents chez les hôtes intermédiaires : consommation de viande infectée d'animaux de rente ou de gibier (mammifères et oiseaux),

-possibilité de transmission congénitale par passage transplacentaire des tachyzoïtes lors d'une phase de parasitémie maternelle chez des mères séronégatives,

-enfin, modes de transmission plus exceptionnels et propres à l'homme : transmission par greffon lors de transplantation, transmission lors de transfusion ou par inoculation accidentelle (accident de laboratoire) (*Herwaldt B.L., 2001*).

Figure 6: Sources et modes de contamination humaine par Toxoplasma gondii (AFSSA, 2005)



La prévalence de la toxoplasmose chez l'homme varie de 7 à 80% selon les pays (*AFSSA, 2005*). En France, elle était de 43,8% en 2003 avec des variations régionales mal expliquées (*Berger F., 2005*).
Ces différences entre pays s'expliquent par les conditions climatiques, les modes de vie et les habitudes alimentaires. L'incidence de la toxoplasmose dans la population générale est difficile à évaluer car l'infection est le plus souvent asymptomatique. En France, on a pu estimer par modélisation le nombre annuel de nouvelles infections (à partir des données de prévalence de l'enquête Périnatalité de 1995) : ce nombre est compris entre 200 000 et 300 000 cas avec environ 30 000 à 45 000 cas symptomatiques (*AFSSA, 2005*). Le nombre de cas déclarés de toxoplasmose chez les patients porteurs du VIH est d'environ 200 par an.
La proportion de séroconversion chez la femme enceinte séronégative était comprise entre 5,4 et 13,2 cas pour 1000 femmes séronégatives en 1995, et l'incidence est plus marquée chez les primipares. Le nombre de séroconversions chez les femmes enceintes a été estimé à 2700 pour l'année 2000. En prenant en compte les résultats des amniocentèses et le risque de transmission materno-foetale de 29%, le nombre d'enfants nés vivants avec une toxoplasmose congénitale a été estimé à 600 cas environ. En se référant aux données d'études de cohortes d'enfants infectés, il a été estimé que sur 600 cas, 174 enfants auraient des séquelles dont 11 une hydrocéphalie et 145 une rétinochoroïdite (*AFSSA, 2005*). En réalité, des travaux plus récents du centre national de référence (CNR) de la toxoplasmose révèlent une incidence moindre de la toxoplasmose congénitale : environ 200 cas par an (*Villena I., communication personnelle*).

2.2. Conséquences cliniques chez l'homme

La toxoplasmose est cliniquement inapparente dans environ 80% des cas, y compris chez la femme enceinte séronégative (*AFSSA, 2005*).
La toxoplasmose humaine est médicalement grave dans diverses situations :
-lors de forme grave de toxoplasmose acquise (formes septicémiques et nerveuses) : rares, mais d'un pronostic très sombre,
-lors d'une immunodépression induisant une réactivation de kystes latents, qui peut être à l'origine d'une toxoplasmose de rechute très grave,
-lors de séroconversion d'une femme enceinte (primo-infection avec risques de transmission de tachyzoïtes au fœtus).

▪ La toxoplasmose chez les individus immunocompétents

Chez les individus immunocompétents, l'infection toxoplasmique reste généralement asymptomatique ou bénigne car un état de résistance immunitaire est rapidement acquis.

Lorsqu'elle s'exprime cliniquement, l'infection évolue après une période d'incubation de 1 à 3 semaines. On observe alors un épisode fébrile, pseudogrippal, accompagné d'une polyadénomégalie. Ces symptômes peuvent persister plusieurs mois avant de régresser spontanément sans traitement (*Mc Cabe R.E. et al., 1987*).

Lors de formes sévères de toxoplasmose acquise, l'adénopathie s'accompagne d'atteintes cutanées (érythème polymorphe, nodules, papulomacules, dermatomyosite) et viscérales (hépatiques, myocardiques, péricardiques, pulmonaires ou neurologiques) (*AFSSA, 2005 ; Henriquez S.A. et al., 2009*).
Une toxoplasmose oculaire peut aussi survenir au cours d'une toxoplasmose déclarée. Elle se manifeste surtout par une uvéite avec iritis, choroïdite et choriorétinite.

On associe parfois à la toxoplasmose certaines modifications comportementales et psychologiques ou des maladies neurologiques ou psychiatriques chroniques comme la schizophrénie, mais ceci reste très controversé (*AFSSA, 2005 ; Henriquez S.A. et al., 2009)*.

▪ **La toxoplasmose de l'immunodéprimé**

On l'observe chez les patients atteints par le VIH (virus de l'immunodéficience humaine), souvent sous forme d'une encéphalite toxoplasmique. En France, la fréquence annuelle de la toxoplasmose cérébrale varie de 9,5 à 18% des cas de VIH. Une choriorétinite peut également s'observer chez les sidéens, elle est souvent associée à une localisation cérébrale (*Dupouy-Camet J. et al., 1993*).

▪ **La toxoplasmose congénitale**

Il s'agit de la toxoplasmose prénatale ou néo-natale, par opposition sémantique à la toxoplasmose contractée après la naissance. Le risque est présent chez des mères séronégatives ou immunodéprimées : femmes atteintes de lupus érythémateux disséminé (LES) ou du SIDA (*Tenter A.M. et al., 2000*).

**Conséquences*

En cas de contamination en cours de grossesse, le risque de transmission materno-fœtale est de 29% (*AFSSA, 2005*).
La fréquence et la gravité de la toxoplasmose placentaire dépendent de la date de l'infection maternelle et du stade de gestation : la fréquence est d'autant plus grande que la grossesse est avancée, la gravité d'autant plus élevée que l'infection est précoce (en cas d'infection précoce, on peut observer

des avortements ou des résorptions embryonnaires). La période la plus dangereuse, associant gravité et fréquence, se situe entre la 10ème et la 20ème semaine d'aménorrhée, correspondant au 2ème trimestre de la grossesse.

Les répercussions possibles sont nerveuses : méningo-encéphalomyélite, hydrocéphalie par sténose de l'aqueduc de Sylvius (bombement des fontanelles, périmètre crânien augmenté), calcifications intracrâniennes responsables de séquelles à évolution tardive (retards psychomoteurs, convulsions, modification des réflexes) et oculaires : choriorétinite, nystagmus, strabisme, microphtalmie. En plus des manifestations neuro-oculaires, on observe parfois un syndrome polyarthrite chronique (maladie de Still) ou une atteinte généralisée sévère avec exanthème maculo-papulaire, purpura, pneumonie, ictère et hépato-splénomégalie (qui peut aussi survenir seule).

Globalement, l'infection toxoplasmique s'exprime de 2 façons chez le nouveau-né : clinique ou subclinique, cryptosymptomatique : des séquelles neurologiques ou ophtalmologiques menacent de se manifester plus tard.

L'affection anténatale est donc très polymorphe et certaines manifestations n'apparaissent que très tardivement.

**Diagnostic*

Le diagnostic clinique de la toxoplasmose congénitale repose sur la triade : choriorétinite, hydrocéphalie, calcifications intracrâniennes. L'imagerie médicale permet actuellement le diagnostic anténatal des atteintes cérébrales (échographie de morphologie fœtale ou imagerie par résonance magnétique).

Le suivi sérologique mensuel (titrage des anticorps IgG et IgM) des femmes enceintes séronégatives a été rendu obligatoire en France depuis 1992 (*voir infra*). Il permet d'établir le diagnostic d'une toxoplasmose acquise en cours de grossesse.

Si une séroconversion maternelle survient pendant la grossesse, une surveillance échographique mensuelle est pratiquée à la recherche de signes évocateurs de toxoplasmose congénitale : dilatation des ventricules cérébraux, hépatomégalie fœtale, ascite fœtale, calcifications intracrâniennes. L'absence d'anomalies observées ne permet en aucun cas d'exclure une toxoplasmose congénitale.

Les risques toxoplasmiques imposent donc à l'heure actuelle un lourd suivi chez la femme enceinte, témoignant de l'importance majeure de cette zoonose en santé humaine.

3. Méthodes de lutte et de prévention

3.1. Les principaux médicaments existants

Les médicaments actifs se regroupent en deux grandes familles : (*AFSSA, 2005*)

-les inhibiteurs de la synthèse de l'acide folique (effet antiparasitaire puissant) : inhibiteurs de la déhydrofolate réductase : DHFR (*pyriméthamine*, *triméthoprime*) et sulfamides (*sulfadiazine*, *sulfadoxine*, *sulfaméthoxazole*). L'association d'un inhibiteur de la DHFR et d'un sulfamide est très synergique sur *Toxoplasma gondii*.

-les macrolides (parasitostatiques à des concentrations élevées) : *spiramycine*
La *clindamycine* (famille des lincosamides) a des caractéristiques pharmacologiques voisines de celles des macrolides ; elle est utilisée en 2ème intention en association avec la *pyriméthamine* dans le traitement des toxoplasmoses cérébrales ou oculaires.

Toutes ces molécules n'agissent que sur les tachyzoïtes et sont sans effet sur les kystes.
La seule molécule active à la fois sur les tachyzoïtes et les kystes de *Toxoplasma gondii* est l'*atovaquone,* mais son utilisation reste très limitée par sa mauvaise biodisponibilité.

En médecine humaine, on utilise généralement l'association *pyriméthamine* + *sulfadiazine* aussi bien lors de formes graves chez les patients immunodéprimés que chez la femme enceinte lors de toxoplasmose fœtale établie. Cependant l'efficacité des différentes thérapeutiques mises en place actuellement reste très controversée. La limite majeure reste l'inactivité des traitements sur les kystes parasitaires et donc l'absence de contrôle des réactivations (surtout chez les individus immunodéprimés).

3.2. Réglementation et mesures de prévention

En France, depuis 1992, la surveillance sérologique mensuelle des femmes enceintes est obligatoire de la déclaration de la grossesse jusqu'au terme. Dans les autres états européens, seules des recommandations sont préconisées.
D'un point de vue vétérinaire, aucun plan de surveillance de la toxoplasmose animale n'a été mis en place pour l'instant. La toxoplasmose n'est pas une zoonose à déclaration obligatoire et n'entre pas dans le cadre de l'examen de salubrité des viandes en abattoirs. Ceci conduit sur le plan national à une méconnaissance de la prévalence de cette pathologie en élevage et de son incidence sur les avortements.

Au niveau européen, la **directive 2003/99/CE** classe tout de même la toxoplasmose parmi les zoonoses à surveiller en fonction de la situation épidémiologique.

Il existe par contre de multiples listes de recommandations à destination des personnes à risque (femmes enceintes, immunodéprimés) pour la prévention de la toxoplasmose (*Voir Annexe 3*). On peut les regrouper en différentes rubriques (*AFSSA, 2005*) :
-hygiène alimentaire
-hygiène corporelle
-précautions vis-à-vis des chats
-précautions concernant le mode de vie et les activités
Ces conseils ne sont pas tous validés et l'application de ces mesures n'est pas vérifiée sur le terrain.

A ce sujet, les vétérinaires sont susceptibles de conseiller leurs clientes enceintes et de mettre l'accent sur le rôle prépondérant de l'alimentation par rapport au contact avec les chats, surtout si ces derniers sont nourris avec des aliments cuits, de préférence industriels et sortent peu. Par précaution supplémentaire, il peut être judicieux d'empêcher le chat de chasser (en réduisant ses sorties et en lui attachant une clochette autour du cou afin de faire fuir les proies potentielles).

L'efficacité partielle des traitements disponibles, l'application aléatoire et non contrôlée des mesures de précautions recommandées, le suivi fastidieux qu'impose la menace toxoplasmique durant la grossesse…sont autant d'arguments en faveur de la mise en place d'une vaccination contre la toxoplasmose zoonose. Mais quels en seraient les objectifs et les cibles : animaux destinés à la consommation, chat, homme… ?

Le coût d'une vaccination systématique des animaux de boucherie serait très élevé, de plus, le vaccin vivant atténué existant chez les ovins prévient les avortements sans pour autant garantir une protection contre l'infection et son efficacité sur d'autres animaux reste à évaluer.

Aucun vaccin n'existe pour l'heure ni chez le chat, ni chez l'homme et les nombreuses études en cours sur animaux de laboratoire restent à un stade peu avancé du fait des contraintes éthiques qui s'appliquent en expérimentation humaine.

La place centrale du chat dans le cycle parasitaire soulève légitimement la question de l'impact d'une vaccination féline. Est-ce un axe majeur à emprunter dans la gestion de cette zoonose mondiale, avec quels outils vaccinaux et quelle serait la population de félins cibles ?

Nous tenterons d'apporter quelques lumières à ces questionnements au sein des deuxième et troisième parties.

II. IMPORTANCE DU CHAT DANS LA CIRCULATION DE *TOXOPLASMA GONDII*.

Le chat (et autres félidés), en tant qu'uniques hôtes définitifs, jouent un rôle majeur dans la dissémination du parasite dans l'environnement. Les risques en découlant sont difficiles à évaluer étant donnée l'importance de la population féline (on estime à 9 millions le nombre de chats domestiques en France, *AFSSA, 2005 : source Afirac*), sans compter les chats errants et sauvages, et les nombreux hôtes intermédiaires pouvant être contaminés. Par contre, le rôle direct du chat dans la contamination humaine semble limité puisque la période d'excrétion des oocystes est transitoire, ne concerne en général que les jeunes animaux et que le risque de contamination à partir du pelage est quasi nul.

Nous aborderons dans un premier temps la complexité clinique et diagnostique de la toxoplasmose féline (symptomatologie et expression lésionnelle, réponse immunitaire induite et méthodes diagnostiques disponibles). Puis nous nous intéresserons, après quelques considérations épidémiologiques, à la place privilégiée du chat dans le cycle parasitaire : les particularités de l'excrétion ookystale chez cet hôte définitif.

A. Rappels

1. La toxoplasmose féline

Chez le chat adulte, la toxoplasmose clinique est rare. Les manifestations cliniques se développent surtout chez les jeunes (immunologiquement fragiles) ou chez les animaux ayant une immunité compromise par la maladie ou le traitement.

1.1. Symptômes

▪ La toxoplasmose acquise

**Forme aiguë ou évolutive*

On distingue deux phases au cours de l'infection toxoplasmique chez les félidés, dont les symptômes diffèrent :

La phase intestinale (cycle sexué du parasite). On la dénomme aussi « **cocciodiose toxoplasmique** ». Cette phase passe souvent inaperçue, même à la suite d'une infection importante par ingestion de millions d'ookystes (*Dubey J.P., 1996*). Des diarrhées et des vomissements ont pu être observés chez certains chats infectés par ingestion de kystes à bradyzoïtes. Chez les adultes, ces manifestations disparaissent spontanément mais certains chatons peuvent y succomber (*Dubey J.P. et al., 1972*).

La phase extra-intestinale (cycle asexué du parasite). Cette phase est polymorphe et les symptômes de la forme aiguë sont peu caractéristiques :

-hyperthermie persistante, ne répondant pas aux traitements antibiotiques,

-adénopathie généralisée (surtout mésentérique),

-signes respiratoires : broncho-pneumonie (toux, dyspnée, amygdalite associée), pneumonie, pleurésie,

-troubles digestifs : diarrhée, vomissements, voire gastro-entérite hémorragique,

-atteintes hépatique (ictère, ascite) et pancréatique,

-symptômes oculaires : kératite, uvéite, choriorétinite,

-signes nerveux centraux (méningo-encéphalite) ou périphériques (polyradiculonévrites caractérisées par une parésie évoluant vers la paralysie, myoclonies, etc),

-signes musculaires (polymyosites : démarche anormale, amyotrophie, myalgies),

-atteintes cardiaques (rares).

Cette forme généralisée peut évoluer assez rapidement, les symptômes respiratoires étant prédominants et parfois fatals (le chaton peut mourir en une semaine) (*Dubey J.P. et al., 1993*).

Les virus de l'immunodéficience féline (FIV) et de la leucose féline (FeLV) ont parfois été incriminés dans une plus grande sensibilité des chats à la toxoplasmose (symptômes et lésions plus sévères que les chats indemnes) (*Davidson M.G. et al., 1993*). Cependant, cette affirmation est sujette à controverses, et il a été montré que l'infection par le FIV de chats préalablement infectés par *Toxoplasma* ne modifie pas l'évolution de la toxoplasmose et n'induit pas de rechute de l'infection acquise (*Lappin M.R. et al., 1992*).

**Forme chronique*

Elle concerne plutôt les animaux adultes et peut se traduire par une forme intestinale, oculaire, nerveuse ou une simple hyperthermie (*Dubey J.P, 1986*).

La forme intestinale se manifeste par un amaigrissement et un mauvais état général, des signes digestifs d'intensité variable et la formation de granulomes et d'ulcères associés à une réaction des nœuds lymphatiques mésentériques (confusion possible avec des masses tumorales, des fécalomes ou une intussusception).

La forme oculaire est la plus évocatrice de toxoplasmose féline, même si les lésions ne sont pas pathognomoniques d'une atteinte toxoplasmique. Leur physiologie impliquerait des mécanismes

immunologiques. Elle se traduit par une rétinite, une choriorétinite et/ou une uvéite (uni ou bilatérale). L'atteinte initiale touche en général le segment postérieur de l'œil.

La forme nerveuse: il y a atteinte progressive du système nerveux central et apparition de convulsions. Une atteinte respiratoire peut être assosiée.

**Forme asymptomatique ou latente*

C'est la forme la plus fréquente de la maladie. L'animal s'immunise suite à une infection inapparente mais des symptômes peuvent apparaître lors d'une réactivation.

- **La toxoplasmose congénitale**

Elle fait suite à une primo-infection chez une femelle gestante et se traduit par une mortalité néonatale vers 15-20 jours (*Sato K. et al., 1993*). Les chatons présentent une atteinte respiratoire (pneumonie), ainsi que des troubles nerveux centraux (encéphalite), hépatiques (hépatite) et parfois oculaires (atteinte de la choroïde et inflammation secondaire de la rétine avec uvéite antérieure fréquente) (*Davidson M.G., 2000*).Le pronostic dans ce cas est sombre et le chaton meurt rapidement.

La toxoplasmose congénitale reste cependant rare dans l'espèce féline, voire exceptionnelle, contrairement au chien et aux petits ruminants.

2.2. Lésions

Les lésions sont surtout hémorragiques et nécrotiques lors de forme aiguë, granulomateuses lors de forme chronique (*Bourdeau P., 1993*). Selon Dubey (*Dubey J.P. et Carpenter J.L., 1993*), les localisations des lésions dans 100 cas de toxoplasmose confirmée étaient pulmonaires dans 98% des cas (multiples nodules grisâtres), neurologiques dans 96% des cas (zones hémorragiques, nécrotiques, atrophie cérébelleuse), hépatiques dans 93% des cas (hypertrophie, cholangiohépatite), cardiaques (86%), pancréatiques (84%) et oculaires (81%). Les nœuds lymphatiques présentent aussi fréquemment une adénopathie généralisée prenant parfois un aspect pseudo tumoral (ganglions mésentériques surtout).

Les lésions oculaires sont les plus évocatrices de toxoplasmose féline mais n'en sont cependant pas pathognomoniques. On observe des lésions de choroïdite et de rétinite, avec parfois une opacification et des hémorragies dans le vitré. L'uvéite antérieure est fréquente, avec atteinte de l'iris et du corps ciliaire (*Davidson M.G. et al., 2000*). Le fond d'œil révèle des lésions multifocales gris foncé, hyporéflectives et des infiltrats blancs duveteux autour.

Photo 1: Lésions oculaires chez un chat atteint de toxoplasmose (source : S. Chahory)

On observe une uvéite antérieure avec altération de la transparence cornéenne (néovascularisation et précipités kératiques= dépôts endothéliaux). L'animal présente également un myosis.

Lors de forme asymptomatique, les lésions sont inexistantes, un faible nombre de kystes sont présents dans le système nerveux central mais sans réaction inflammatoire associée.

2. L'immunité anti-toxoplasme chez l'hôte définitif

Face à une agression parasitaire de *Toxoplasma gondii,* tout organisme immunocompétent développe une double réponse humorale et cellulaire relativement efficace et durable, qui permet de limiter la multiplication des tachyzoïtes et leurs effets pathogènes. Cette réponse a été et est toujours largement étudiée. En effet, le développement d'un vaccin félin efficace contre *Toxoplasma gondii* implique avant tout une parfaite compréhension de la relation hôte-parasite et notamment des mécanismes de régulation de la réponse immune induite par l'infection toxoplasmique.

2.1. La réponse immune spécifique générale

Cette réponse immune est complexe, elle met en jeu de nombreuses interactions et varie avec les sites anatomiques analysés, la souche de parasite impliquée ainsi que la voie d'infection. Au départ, une réponse innée (non spécifique) se met en place et limite la multiplication des tachyzoïtes. Elle fait intervenir notamment les cellules NK et induit la production d'IL 12, d'IFN γ et de TNF α.

Cette réponse innée amorce le développement d'une réponse immune spécifique humorale et cellulaire de type 1 (avec mise en jeu des LT $CD8^+$ cytotoxiques).
Les lymphocytes T, selon la production de lymphokines induite, se divisent en deux groupes ; en simplifiant:
-les clones Th1, qui sécrètent l'IL 2 et l'IFNγ,
-les clones Th2, qui sécrètent l'IL4, l'IL5, l'IL 10 et qui neutralisent les effets du TNF α, de l'IFN γ et de l'IL 12.
L'orientation de la réponse cellulaire vers un type Th1 ou Th2 a une importance dans le cas de l'immunité anti-toxoplasme, les cytokines de type 2 antagonisant les effets bénéfiques de la réponse de type 1 sur la neutralisation du parasite mais permettant de limiter les effets délétères et pathologiques de cette réponse (inflammation excessive ayant notamment des répercussions digestives).

▪Réponse immune en phase infectieuse aigüe

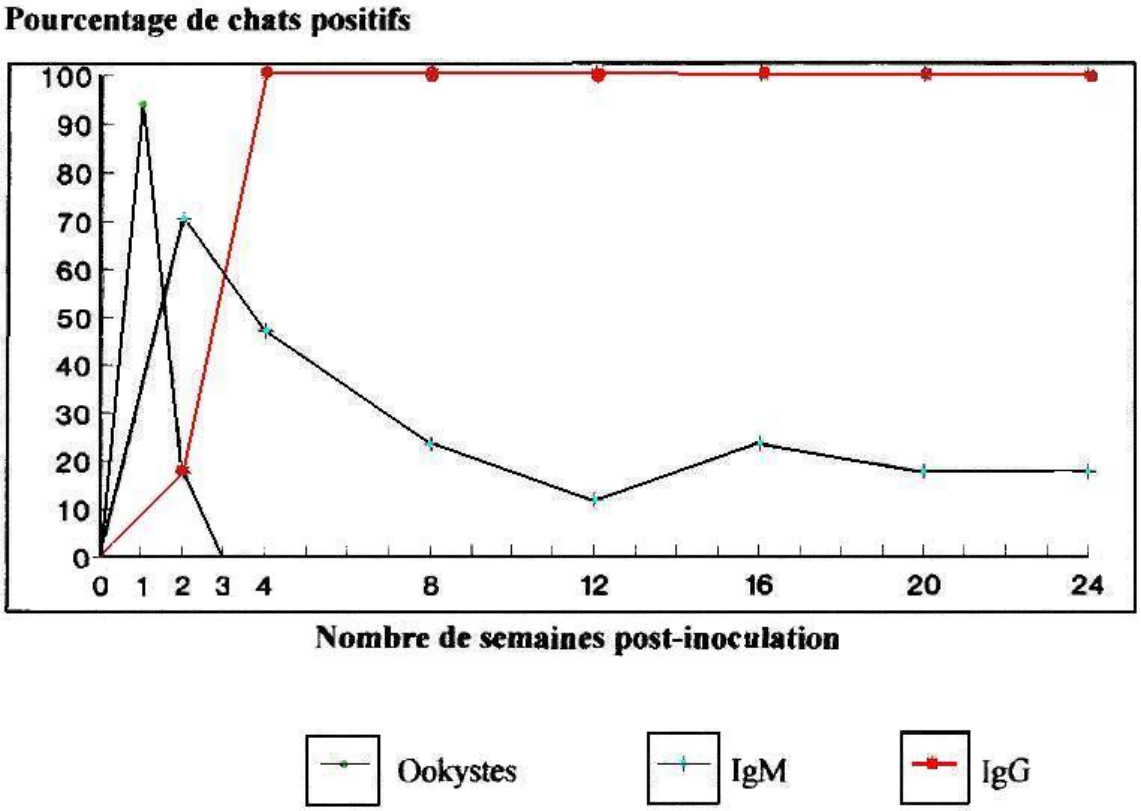
Réponse immune à médiation humorale

Profil cinétique de la réponse humorale spécifique (*Bourdeau P., 1993 ; Dubey J.P. et Beattie C.P., 1988 ; Lappin M.R., 1994*)

L'infection expérimentale de chats (par ingestion de kystes de *Toxoplasma gondii*) et le dosage des anticorps sériques spécifiques a permis d'établir le profil cinétique de la réponse humorale spécifique pour différentes classes d'immunoglobulines (M, G et A) (*figure 8*).
-IgM spécifiques: apparition dans les 2 à 4 semaines qui suivent la primo-infection.
Le pic a lieu dans les 3 à 6 semaines puis le titre se négative majoritairement avant 12 semaines. Les IgM ne passent pas la barrière placentaire ; elles reconnaissent principalement les antigènes somatiques (*Fortier B. et al., 1993*).
Le titre en IgM peut demeurer positif après 12 semaines chez certains chats cliniquement malades (*Lappin M.R .et al., 1989*) mais uniquement lors de toxoplasmose oculaire ou d'infection concomitante par le FIV. Un titre positif peut être à nouveau détecté pendant un court laps de temps après disparition totale des IgM initiales lors de réactivation des kystes tissulaires suite à une dépression immunitaire (co-infection par le FIV, administration de glucocorticoïdes à forte dose).
-IgG spécifiques: apparition dans les 2 à 4 semaines suivant l'ingestion de kystes, atteinte du niveau maximal entre la $4^{ème}$ et la $6^{ème}$ semaine. Le titre peut rester à un niveau élevé pendant des mois à plusieurs années (*Euzeby J., 1998*). Les IgG traversent la barrière placentaire.
-IgA sériques: apparition entre 4 et 6 semaines après ingestion des kystes. Le titre reste positif au moins 26 semaines après inoculation. On ne peut donc pas chez le chat corréler la présence d'IgA à

une phase d'infection active en cours ou récente. Ces immunoglobulines révèlent essentiellement les antigènes de rhoptries (et les antigènes membranaires).

Figure 7: Résultats des sérologies pour la toxoplasmose (IgM et IgG) et de la coproscopie dans un groupe de 17 chats contaminés expérimentalement par ingestion de bradyzoïtes (>10^3 de la souche ME 49) (Lappin M.R., 1994)



Actions des anticorps sur le parasite

-Les anticorps agissent sur les tachyzoïtes extracellulaires et permettent de diminuer leur multiplication en lysant le parasite en présence du complément,

-Par opsonisation, ils permettent d'augmenter la phagocytose par les macrophages,

-Ils participent au phénomène d'ADCC (Antibody Dependent Cell Cytotoxicity),

Par contre, les anticorps n'ont pas d'action sur les formes intracellulaires du parasite.

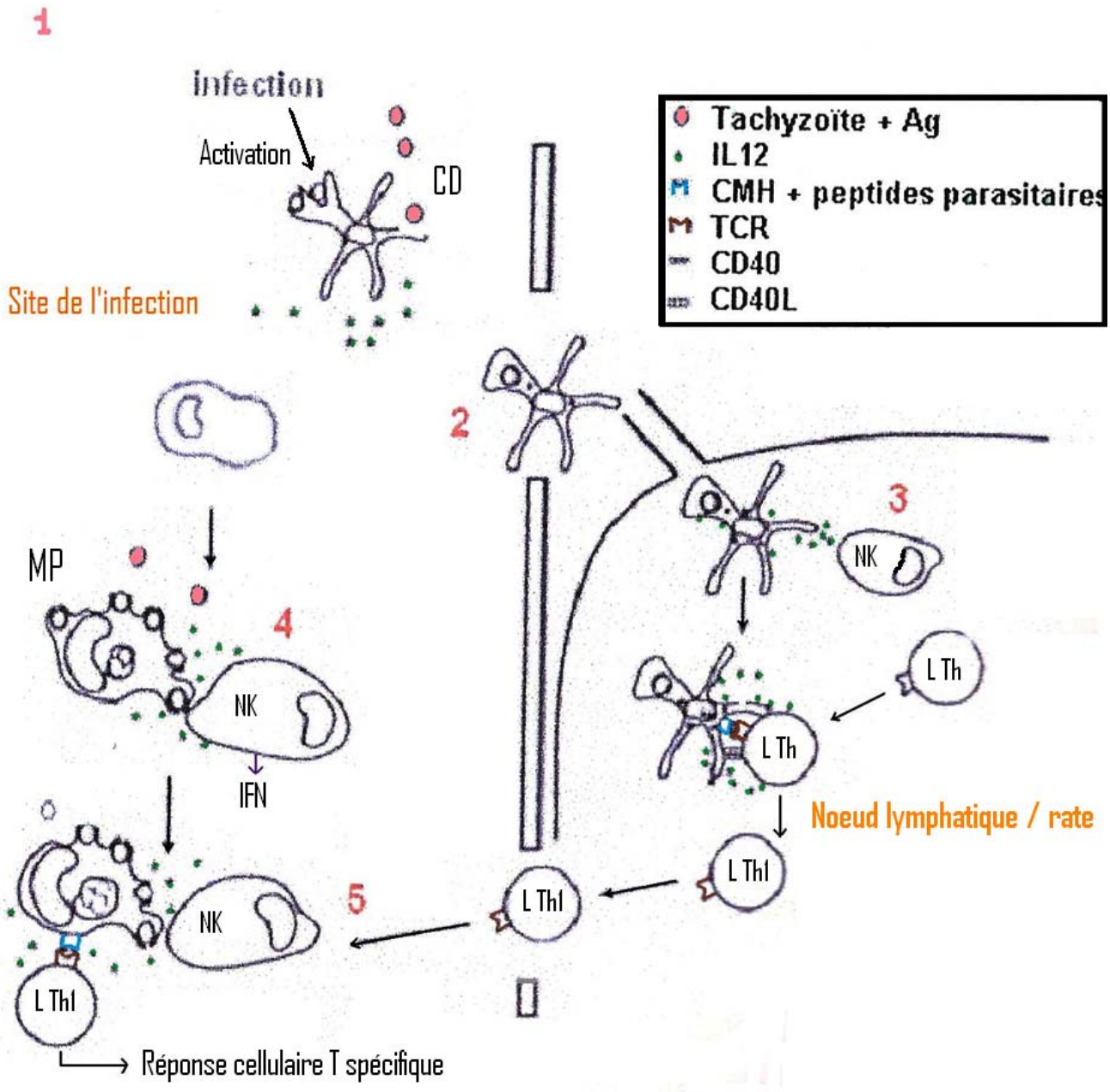
**Réponse immune à médiation cellulaire*

L'immunité cellulaire a un rôle majeur dans la protection contre l'infection toxoplasmique (*Frenkel J.K., 1967*).

Réponse cellulaire non spécifique (*Dardé M.L.et Peyron F., 2002*) (*figure 9*)

L'**interleukine 12** (IL12) est la cytokine initiatrice de l'activation non spécifique. Avec le **TNF α**, elle permet l'activation des principales cellules effectrices du système immunitaire inné.

Figure 8: Réponse immune non spécifique et initiation de la réponse T adaptative (modèle murin) (Sergent V., 2002)



1. *Après infection, les parasites et/ou les extraits parasitaires activent les cellules dendritiques (CD).*

2. *Les cellules dendritiques activées migrent au nœud lymphatique drainant et à la rate.*

3. *L'IL12 sécrétée par les CD active les lymphocytes Natural Killer (NK) qui migrent au site de l'infection. Les CD initient aussi la réponse T spécifique en présentant les antigènes parasitaires aux LTh.*

4. *Les NK activés produisent de l'INFγ, qui entretient l'activation des macrophages (MP) et les MP activés sécrètent de l'IL12 qui maintient l'état d'activation des NK.*

5. *Les LTh1 matures migrent au site de l'infection où ils initient une réponse cellulaire spécifique du toxoplasme.*

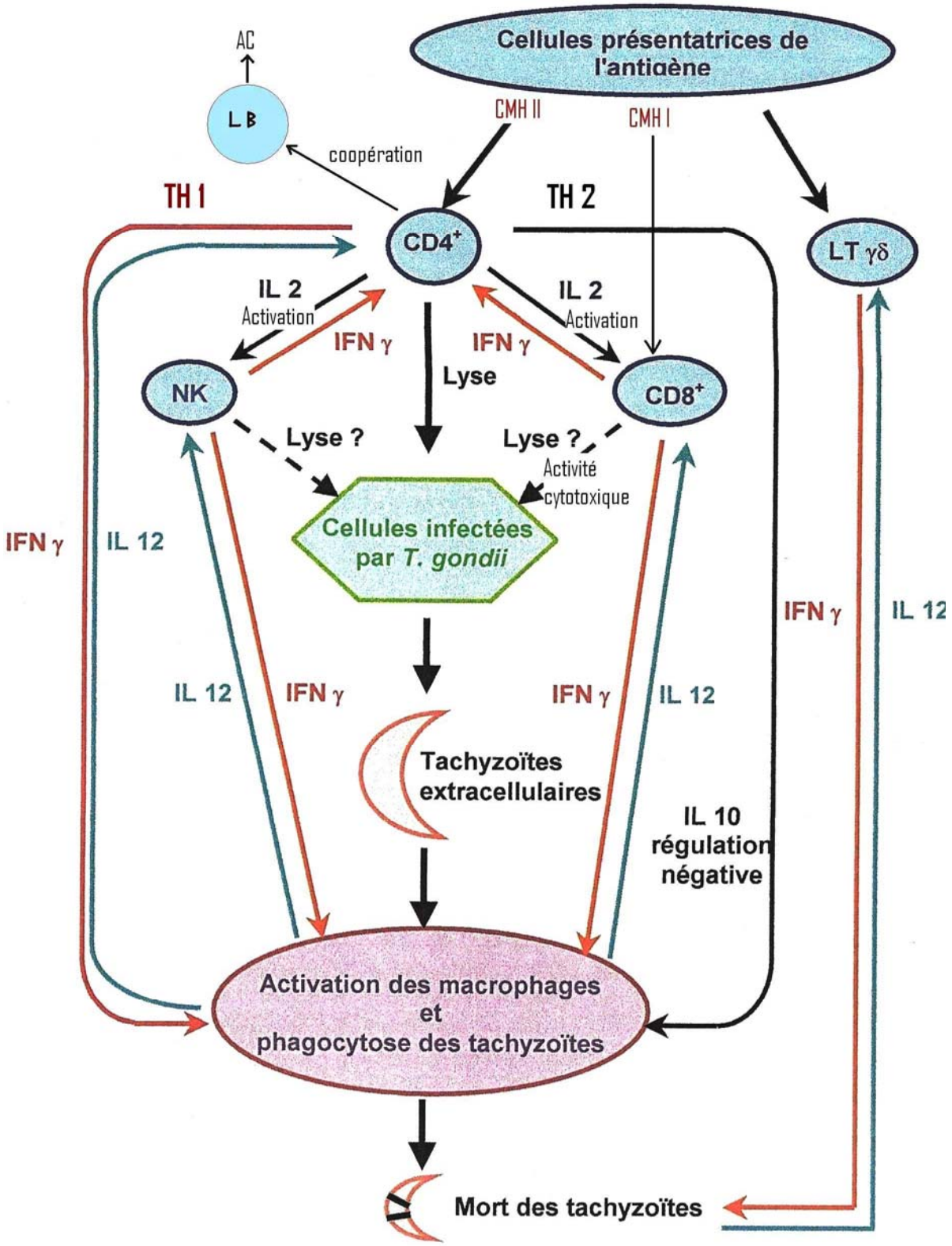
Réponse cellulaire T spécifique (*figure 10*)

Les cellules T de l'immunité acquise sont recrutées et activées par l'IL12 synthétisée par les CD et les MP activés (*Wilson D.C. et al., 2008*). Les lymphocytes T CD4+ reconnaissent les Ag toxoplasmiques associés aux molécules du CMH II à la surface des cellules présentatrices d'antigène (CPA) et ont principalement un rôle de cellules « helper » en coopérant avec les LB pour la production d'anticorps (Ac) et en sécrétant l'IL2 qui entretient l'activation des NK et des LTCD8+. Les LTCD8+ reconnaissent les antigènes (Ag) toxoplasmiques associés au CMHI, à la surface des CPA et acquièrent principalement une activité cytotoxique. Parmi la population de lymphocytes T, les LTCD8+ sont considérés comme les effecteurs majeurs de la réponse immune cellulaire, les LTCD4+ jouant un rôle synergique (*Bhopale G.M., 2003*).

Les LTCD8+ sécrètent l'INFγ et montrent *in vitro* une cytotoxicité envers les cellules infectées; les LTCD4+ Th1 exercent leur effet protecteur par la production d'INFγ et d'IL-2. Par contre, les LTCD4+ Th2 produisent des cytokines associées à une régulation négative de la réponse cellulaire protectrice (IL 4, IL 5 et IL 10).

La réponse immune de type Th1 est prédominante dans les conditions naturelles (*Denkers E.Y. et al., 1998*) bien qu'une réponse modérée de type Th2 ne soit pas nuisible car elle permet de minimiser les phénomènes immunopathologiques liés à une inflammation excessive et à la réponse immune de type 1 (*Gazzinelli R.T. et al., 1996*).

Figure 9: Interactions entre les différents types cellulaires intervenant dans les mécanismes immunitaires à médiation cellulaire lors d'une infection par Toxoplasma gondii (Sergent V., 2002, d'après Sher A.et Coffman R.L., 1992)



*****_Rôle particulier de l'IFNγ dans la réponse immunitaire anti-toxoplasme._

En phase aiguë, il y a une forte production d'IFNγ par les NK et les LTCD8+, il est le pivot de la réaction immunitaire cellulaire, aussi bien dans la résistance à une nouvelle infection que dans le contrôle de l'infection chronique.

Cette cytokine a un rôle majeur dans la protection contre l'infection toxoplasmique par divers mécanismes :

-l'IFNγ induit l'expression d'une enzyme par les macrophages: une oxyde nitrique synthétase inductible (iNOs) qui dégrade l'arginine en citrulline (*Sher A. et al. 1998*). Au cours de cette réaction, du NO est produit, ayant une action toxoplasmicide et un effet microbiostatique par l'induction de la conversion des tachyzoïtes en bradyzoïtes par inhibition de la respiration mitochondriale (*Miller C.M. et al. 1999*). Il y a donc favorisation de la formation de kystes à partir de pseudokystes,

-il induit l'expression d'une autre enzyme dans les MP et les fibroblastes : l'indolamine 2-3 dioxygénase, dégradant le tryptophane intracellulaire. Le toxoplasme ainsi privé de cet acide aminé ne se réplique plus (*Pfefferkorn E.R., 1984*),

-il active une famille d'enzymes: les p47 GTPases (guanosine triphosphatases), qui dégradent la vacuole parasitophore (PV) dans les cellules infectées et sont impliquées dans le mécanisme d'autophagie (*Martens et al., 2005*),

-il active les entérocytes qui limitent alors la disponibilité du fer intracellulaire, ceci inhibe la réplication intracellulaire du toxoplasme (*Dimier I.H. et al. 1998*),

-c'est un facteur important pour la différenciation des lymphocytes T cytotoxiques et il augmente l'expression des molécules du CMH, ce qui favorise les fonctions effectrices de ces LT (*Suzuki Y. et al. 1991*).

▪Réponse immune en phase chronique

Le contrôle de la multiplication parasitaire pendant la phase chronique de l'infection n'est pas encore totalement élucidé. Les défenses immunitaires spécifiques seraient stimulées de façon permanente par les exoantigènes synthétisés par les bradyzoïtes. Il y aurait aussi régulièrement rupture de kystes tissulaires, ce qui libérerait des tachyzoïtes issus de la transformation de bradyzoïtes, ils entretiendraient ainsi la stimulation du système immunitaire (et seraient éliminés chez un hôte immunocompétent) (*Suzuki Y. et al. 1991*). Ceci expliquerait que les Ac dirigés contre la protéine P30 (exprimée uniquement à la surface des tachyzoïtes) persistent durant la phase chronique.

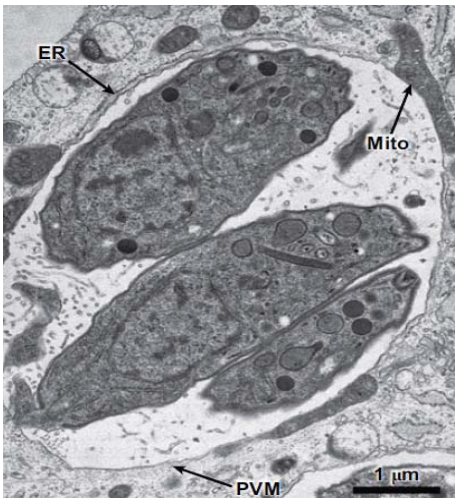
Par ces mécanismes, l'immunité anti-toxoplasme (humorale ou cellulaire) est régulièrement entretenue et persiste vraisemblablement toute la vie de l'hôte. Chez un chat immunocompétent séropositif, lors de réexposition ou de rupture de kystes, le parasite est donc rapidement neutralisé.

▪**Mécanismes d'échappement du parasite à la réponse immune spécifique générale**

*****_Stratégies lors de l'entrée dans la cellule hôte et vacuole parasitophore (PV)_

L'internalisation des microorganismes par les phagocytes entraîne généralement la production de dérivés oxygénés toxiques par « flambée oxydative ». Les tachyzoïtes de *Toxoplasma gondii* infectent les cellules hôtes par un processus d'invasion actif aboutissant à la formation d'une vacuole parasitophore (PV), et n'étant pas associé à une production de métabolites oxydatifs (*Hall B.F.et Joiner K.A., 1991*). Par la suite, *Toxoplasma gondii* réside et se réplique dans cette PV pendant toute la durée de son cycle intracellulaire. Elle ne fusionne pas avec les autres organites cytoplasmiques (lysosomes, endosomes), et protège donc le parasite (*Plattner F. et Soldati-Favre D., 2008*). La PVM (membrane de la vacuole parasitophore) de *Toxoplasma gondii* subit par la suite des remaniements qui permettent la formation de la paroi du kyste, ceci coïncidant avec la différenciation des tachyzoïtes en bradyzoïtes.

Illustration 3: Vacuole parasitophore contenant des toxoplasmes, associée avec une mitochondrie de la cellule hôte (Mito) et son réticulum endoplasmique (ER). Image au microscope électronique d'après Dubremetz J.F. (Plattner et Soldati-Favre D., 2008)



La PV assure au parasite une parfaite protection contre l'autophagie, et maintient un pH favorable, tout en permettant les échanges d'éléments vitaux.

*****_Inhibition des mécanismes apoptotiques_

Les cellules infectées par des parasites intracellulaires peuvent programmer leur propre mort : c'est l'apoptose, qui permet de contrecarrer l'invasion du pathogène. Les cellules apoptotiques sont reconnues et phagocytées par les macrophages, et le parasite est détruit simultanément. Deux types de molécules sont connus pour leur capacité à interrompre ce mécanisme et utilisés par le toxoplasme :

les protéines de choc thermique (HSP, *heat shock proteins*) et un facteur de transcription (NF-kB, nuclear factor kappa B) régulant la transcription de molécules anti-apoptotiques (*Butcher B.A. et al., 2001* ; *Heussler V.T. et al., 2001*).

Les caspases sont des enzymes intracellulaires qui jouent un rôle dans les changements morphologiques et biochimiques caractéristiques de l'apoptose. Elles sont d'abord synthétisées sous forme de pro-enzymes (zymogènes) et activées en cascade et sont souvent la cible des molécules anti-apoptotiques.

Dans le cas de *Toxoplasma gondii,* l'inhibition de l'apoptose semble avoir lieu par inhibition de l'activation de la caspase 3.

*****_Localisation intranucléaire_

Les tachyzoïtes de *Toxoplasma gondii* sont parfois localisés dans le noyau des cellules hôtes (*Barbosa H.S. et al., 2005*). Aucune trace de la PVM n'a été mise en évidence lors de la localisation nucléaire du parasite. Il est parfois possible d'observer plusieurs tachyzoïtes au sein du même noyau, celui-ci pouvant être plus susceptible à l'invasion parasitaire lorsqu'il contient déjà des tachyzoïtes. Cette invasion nucléaire pourrait être une voie alternative utilisée par le parasite pour sa survie temporaire ou/et un moyen d'échapper à la réponse immunitaire *in vivo*.

2.2. Immunité locale intestinale

Les IgA sécrétées par les plasmocytes du chorion de la muqueuse intestinale jouent un premier rôle de barrière contre l'infection toxoplasmique en empêchant l'invasion des cellules hôtes par le parasite. Une forte réponse muqueuse sécrétrice d'IgA est induite après une infection orale par le toxoplasme contre ses antigènes de surface et intracytoplasmiques (*Chardès T. et al., 1993*). Les souris déficientes en IL 4 sont plus sensibles que les souris normales car cette déficience inhibe la stimulation antigénique des plaques de Peyer, élaboratrices des IgA (*Euzeby J., 1998*).

L'action des IgA au niveau intestinal est complétée par l'action cytotoxique des lymphocytes intra-épithéliaux (IEL) sur les entérocytes et les macrophages infectés. De plus, un phénomène de rejet par un processus d'hypersensibilité de type IV interviendrait également (prolifération des lymphocytes T et sécrétion, notamment par les LTCD4+, de cytokines actives sur les parasites : IFN γ, IL 2) (*Euzeby J., 1998*).

La durée de cette immunité intestinale est pour lors inconnue.

2.3. Immunité et gestation

Pendant la gestation ou la grossesse, le système immunitaire se heurte au problème d'une juste balance entre la nécessité de maintenir un environnement immun tolérant envers le fœtus et celle de protéger ce dernier contre certains pathogènes dangereux. Le rôle du système immunitaire dans les avortements toxoplasmiques précoces n'est pas encore complètement élucidé. Un modèle murin (souris BALB/c) a été utilisé dans ce but, chez lequel on retrouve en grande majorité les aspects de la toxoplasmose congénitale humaine (*Roberts C.W. et Alexander J., 1992*).

▪ Immunité humorale

Seuls 10 à 15% des IgG traversent la barrière placentaire et peuvent avoir une action protectrice sur le fœtus, mais leur délai d'apparition (2 à 4 semaines) peut permettre aux tachyzoïtes de traverser le placenta d'une chatte en gestation. Une primo-infection toxoplasmique est donc dangereuse au cours d'une gestation tandis qu'une toxoplasmose chronique ne présente pas de risques pour le fœtus chez une femelle immunocompétente.

▪Immunité cellulaire
(*Menzies F.M. et al., 2008*)

Durant la gestation, la réponse de type 2 est favorisée car elle est compatible avec sa poursuite tandis que la réponse de type 1 peut être responsable d'avortements. L'infection toxoplasmique, interrompant ces mécanismes complexes d'immunomodulation, a donc des conséquences néfastes sur la gestation.
De plus, certains bouleversements hormonaux et immunitaires fragilisent l'organisme lors de la gestation : (*Euzeby J., 1998*)
-les cellules NK, les LTCD4 et LTCD8, l'IL2 et le TNF α sont diminués, la multiplication tachyzoïtique est donc plus importante et l'infection du fœtus est facilitée,
-en fin de gestation, les taux d'œstrogènes et de progestérone sont maximaux. Les LTCD8 possèdent des récepteurs à œstrogènes, ils ont donc une activité cytotoxique envers les cellules ayant fixé ces œstrogènes. La progestérone favorise le développement des LTh2, ayant une action négative dans l'immunogénèse et elle induit l'inhibition des cellules NK par les LTCD8.
Ceci explique l'augmentation du risque d'infection fœtale au terme de la gestation.

2.4. Importance du statut immunitaire du chat

La plupart des chats sont exposés à *Toxoplasma gondii* tôt dans leur vie : pendant la gestation, au cours de l'allaitement, ou peu après le sevrage. L'infection par le FIV est par contre plus probable à l'âge adulte. Il est donc vraisemblable que l'infection par le virus se produise après l'exposition à *Toxoplasma gondii,* chez des chats présentant une toxoplasmose latente chronique.
La séroprévalence des IgM anti-*toxoplasma gondii* est supérieure chez les chats infectés à la fois par *Toxoplasma gondii* et par le FIV par rapport aux chats seulement infectés par le toxoplasme (*Lappin M.R.et al., 1993*).
Ceci peut s'expliquer de diverses manières :
-le pouvoir immunodépresseur du virus aboutirait à une augmentation des antigènes libérés par les kystes tissulaires d'où une exposition de LB vierges aux Ag toxoplasmiques entraînant une production d'IgM spécifiques,
-une diminution de la réponse immunitaire à médiation cellulaire aboutirait à un retard de permutation de la classe d'Ig (des IgM en IgG).
Par contre, il n'existe actuellement aucune preuve que l'infection par le FIV puisse réactiver une toxoplasmose latente chronique et induire une toxoplasmose clinique, contrairement à ce qui est observé chez l'homme (problème majeur de l'association entre toxoplasmose cérébrale et SIDA en médecine humaine).
De plus, les chats infectés par le FIV ou le FeLV ne semblent pas plus sensibles que les chats sains à l'infection toxoplasmique, on observe simplement une réaction humorale plus importante et retardée chez les chats infectés par le FIV (*Lin D.S., 1992*), (*Davidson M.G. et al. 1993*).
Enfin, l'infection par un rétrovirus ne semble pas induire de réexcrétion d'ookystes par le chat ni modifier les caractéristiques de cette excrétion (durée, quantité) (*Lin D.S., 1992*).

D'autre part, il faut être prudent lors de l'administration de traitements immunodépresseurs (glucocorticoïdes à fortes doses, *azathioprine*, *cyclosporine*, traitements anticancéreux, antimitotiques…) chez des chats infectés par *Toxoplasma gondii* car ils peuvent conduire à une réactivation de bradyzoïtes enkystés et ainsi induire une toxoplasmose clinique et une réexcrétion d'ookystes (*Prelaud P., 1999*).

Bilan de l'immunité anti-toxoplasmique

La grande majorité des chats développent une immunité protectrice suite à une infection primaire par le toxoplasme, l'immunité cellulaire de type Th1 étant le facteur majeur de cette efficacité immunitaire. Cette observation est encourageante pour soutenir l'idée d'une vaccination féline.

3. Méthodes diagnostiques

Les symptômes exprimés lors de toxoplasmose clinique sont peu caractéristiques et le diagnostic différentiel en est plus difficile. On doit donc avoir recours à des examens de laboratoire, mais en réalité, le diagnostic biologique de la toxoplasmose est rarement établi en pratique vétérinaire courante.

3.1. Examens d'orientation

Ce sont les examens les plus faciles d'accès en routine, donc pratiqués en premier face à une symptomatologie variée et non spécifique comme celle de la toxoplasmose.

▪ **Analyse biochimique, hématologique et urinaire** (*Dubey J.P. et Lappin M.R., 2006*)

Ces examens peuvent permettre d'orienter le diagnostic lors de toxoplasmose clinique mais sont inutiles dans le cadre du dépistage des animaux asymptomatiques. Les modifications observées sont très variables d'un individu à un autre et surtout peu spécifiques. Elles sont pour la plupart liées à une localisation viscérale du parasite (sous forme de pseudokystes en phase aiguë ou de kystes en phase chronique) : lésions hépatiques (hypertrophie, foyers de nécrose, cholangiohépatite) et parfois rénales (foyers de nécrose et d'hémorragies du parenchyme).

-**Hématologie** : on observe une anémie normocytaire normochrome modérée et une leucopénie (chez environ 50% des animaux en phase aiguë). Dans les formes chroniques, on note surtout une leucocytose.
-**Biochimie** : augmentation fréquente des enzymes hépatiques (ALT : alanine aminotransférase et AST : aspartate aminotransférase), bilirubine augmentée lors d'ictère, hypoalbuminémie (diminution de 40%), hypocalcémie modérée.
-**Analyse urinaire** : protéinurie modérée chez un faible nombre d'individus, bilirubinurie lors d'ictère.

▪ **Radiographie**

La radiographie thoracique peut être intéressante surtout lors de forme pulmonaire : on observe une densification pulmonaire généralisée (souvent bilatérale et symétrique) de type interstitiel, alvéolaire et péribronchique. Le parenchyme pulmonaire a un aspect granulomateux, avec par endroit des images en « flocons » (*Dubey J.P. et Beattie C.P., 1988*). On peut aussi visualiser un épanchement pleural ou/et abdominal ainsi qu'une hépatomégalie.

3.2. Diagnostic parasitologique

Il repose sur la mise en évidence directe ou indirecte des formes infectantes du parasite.

▪Examen direct

Une étude histologique peut être réalisée sur des prélèvements de tissus pour mettre en évidence des tachyzoïtes ou des kystes. Des colorations immunohistochimiques sont alors utilisées. La qualité des anticorps a récemment été améliorée afin d'éviter les réactions croisées avec d'autres protozoaires comme *Neospora caninum* (*AFSSA, 2005*).
Sur un animal vivant et malade, il est possible de mettre en évidence le parasite à partir de multiples prélèvements : ponction ganglionnaire, ponction de moelle, de poumon, liquide de lavage trachéal ou broncho-alvéolaire (LBA), biopsies diverses…Cependant, la recherche de parasites s'avère plus fructueuse sur des animaux morts (les tissus prélevés sont alors l'encéphale, les poumons, les ganglions, le foie…).
Sur ces coupes histologiques, on observe les caractères d'une nécrose de liquéfaction massive, le tissu nécrosé étant enveloppé par des macrophages et quelques polynucléaires et lymphocytes. De nombreux tachyzoïtes sont visibles à la limite des lésions.

▪Inoculation à la souris *(AFSSA, 2005)*

Cette technique permet d'isoler les toxoplasmes viables. Après inoculation des prélèvements pathologiques à la souris, on ne détecte l'infection qu'après 3 à 4 semaines par mise en évidence d'une synthèse d'Ac et éventuellement par la présence de kystes dans le cerveau des souris inoculées. Le résultat est tardif mais la sensibilité très bonne et la spécificité de 100%. De plus, cette technique permet l'isolement des souches pour une caractérisation ultérieure. Cette technique est utilisée en médecine humaine, beaucoup moins en médecine vétérinaire.

▪Coproscopie

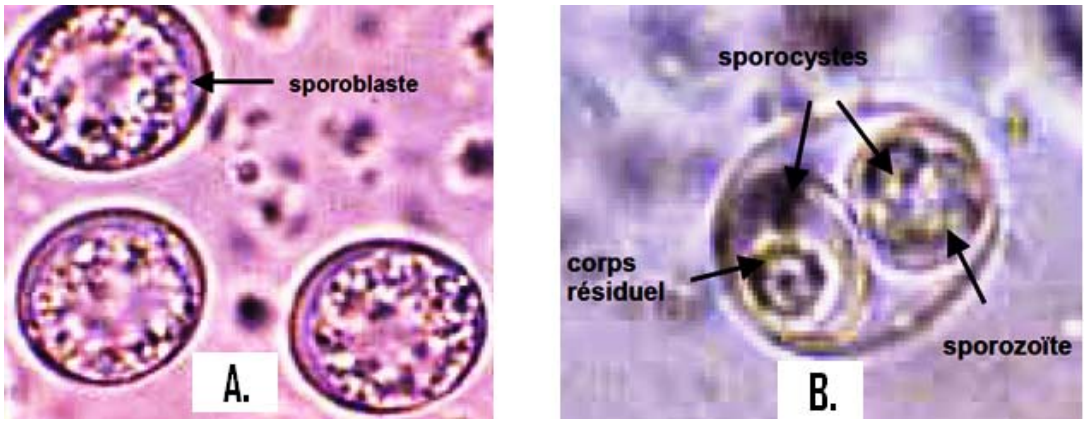
Les ookystes de *Toxoplasma gondii* ont une forme globuleuse, un diamètre d'environ 10-15 µm et ne sont pas segmentés au moment de leur rejet (*cf figures 2 et 3 ; illustration 3*). Ces caractères permettent de les distinguer d'autres coccidies du chat comme *Isospora* et *Cystoisospora* (ovoïdes et plus volumineux) mais les ookystes de *Hammondia* et *Besnoitia* sont morphologiquement semblables à ceux du toxoplasme. On ne les distingue que sur des critères biologiques (ceci nécessite une administration à la souris ou au chat après sporulation). La coproscopie a donc peu de valeur pour le dépistage des chats disséminateurs de *Toxoplasma gondii.* De plus, la période patente de l'infection est

relativement courte et si un état d'immunodépression provoque une nouvelle infection coccidienne, on ne peut pas toujours dépister cliniquement cette infection.

*Illustration 4 : **A**.Oocystes non sporulés (non infectants) émis dans les fèces de chat*

***B**.Oocyste sporulé, infectant, après quelques jours dans le milieu extérieur*

(MO, contraste de phase, x1000) (Source ML Dardé) (AFSSA, 2005).



3.3. Diagnostic sérologique

Les techniques sérologiques peuvent être appliquées à la recherche d'anticorps spécifiques dans le sérum, mais aussi dans le LCR ou l'humeur aqueuse.

▪ **Les différentes méthodes disponibles** (*AFSSA, 2005 ; Bourdeau P., 1993)*

Chez le chat, on recherche des anticorps circulants (IgG et IgM).

*Le test d'agglutination directe modifiée (MAT) est simple à réaliser et possède une bonne spécificité. L'antigène utilisé est une suspension de tachyzoïtes trypsinés puis formolés. On réalise la réaction sur des dilutions de sérum. Cette méthode mesure les Ig totales et le traitement par le 2-mercapto-éthanol permet, en éliminant les IgM, de connaître par différence, la valeur des IgG (*Johnson A.M.et al., 1989*).

*L'immunofluorescence indirecte (IFI) peut être utilisée mais elle nécessite d'employer un conjugué spécifique d'espèce et est peu adaptée aux enquêtes de séroprévalence. C'est malgré tout un test de référence, précoce et fiable, surtout pour les IgG. L'antigène est constitué par des toxoplasmes formolés et fixés sur lames, mis en présence du sérum à tester. Les anticorps présents dans le sérum sont ensuite révélés par un conjugué anti-Ig fluorescent (lecture en lumière UV).

*La technique ELISA : elle est aussi sensible et spécifique que la réaction d'IFI. Cette technique fait appel à un extrait antigénique soluble (cytoplasmique) de toxoplasmes fixés à un

support solide, incubé avec l'échantillon sérique. Les anticorps spécifiques se fixent sur le support sensibilisé par l'antigène et sont ensuite mis en évidence par des anti-IgG ou anti-IgM marqués par une peroxydase.

▪ **Interprétation des résultats :** (*Lappin M.R, 1999)*

-Un titre positif en IgG dans un échantillon sérique traduit une exposition au parasite mais ne permet pas de dater l'infection,
-Un titre en IgM > 1 :256 traduit une infection récente ou active et correspond chez la plupart des chats à la maladie toxoplasmique.
Pour un dépistage sérologique de l'infection toxoplasmique chez le chat, il faut donc comparer la cinétique des IgG en faisant 2 examens à 2 ou 3 semaines d'intervalle (examens devant être réalisés par le même laboratoire). Une infection récente ou active est confirmée si on constate une augmentation du taux d'IgG d'un facteur 4. Il faudrait, en pratique, obtenir également des informations sur l'évolution des IgM.
Il n'existe pas de taux significatifs d'une toxoplasmose maladie mais un taux élevé indique une toxoplasmose évolutive, tandis qu'un taux faible ou modéré d'IgG et stable entre 2 sérologies est en faveur d'une toxoplasmose latente. Dans tous les cas, la positivité des réactions sérologiques signe une infection toxoplasmique mais elle ne peut renseigner sur l'élimination fécale d'ookystes. Par conséquent, les tests sérologiques pratiqués chez des chats sains fournissent peu d'informations exploitables quant à l'excrétion d'ookystes.

Les chatons nés d'une mère atteinte possèdent des IgG (mais pas d'IgM) d'origine placentaire et surtout colostrale, persistant 8 à 12 semaines après la naissance. On ne peut donc pas interpréter des résultats sérologiques positifs avant 12 semaines chez un chaton.

Paradoxalement, un chat séronégatif devrait faire l'objet d'une vigilance supérieure (contrôles sérologiques réguliers si il représente un danger pour l'entourage humain) car s'il s'infecte (et subit donc une séroconversion), il risque d'être excréteur peu de temps après, tandis qu'un chat séropositif n'est souvent plus excréteur au moment du diagnostic sérologique. En effet, la majorité des chats n'excrète des ookystes que lors de la primoinfection, les chats de jeune âge (période post-sevrage) sont donc plus à risque.

2.5 Diagnostic final

En pratique courante, c'est le diagnostic sérologique qui prime pour le dépistage d'animaux sains. On peut s'attendre à une utilisation future de la PCR (Polymerase Chain Reaction) chez le chat, qui a récemment fait l'objet d'importants progrès en matière de diagnostic de la toxoplasmose chez l'homme.
Chez des animaux présentant des signes cliniques évocateurs, les examens d'orientation (examens sanguins et radiographie) sont fréquemment complétés par une sérologie.
En l'absence de diagnostic parasitologique (seul diagnostic de certitude), plusieurs éléments doivent être réunis pour émettre une hypothèse principale de maladie toxoplasmique:
-on doit obtenir un sérodiagnostic positif,
-des signes cliniques évoquant une toxoplasmose s'expriment et les autres étiologies du diagnostic différentiel doivent avoir été écartées,
-une amélioration doit être notée avec le traitement éventuellement mis en place.

Diagnostiquer une toxoplasmose maladie ou simplement dépister un portage chez le chat est donc une entreprise difficile. Malheureusement, les résultats permettent rarement de dater l'infection et de déterminer à quel moment le chat a excrété ou excrètera des ookystes. Seule la coproscopie, seulement si la recherche est positive, peut permettre de répondre à cette question.
L'intérêt du dépistage reste donc très limité car le risque réel émanant du chat pour l'homme est l'excrétion d'ookystes. Nous verrons par la suite les particularités de cette excrétion.

4. Traitement de la toxoplasmose féline

Le traitement médical de la toxoplasmose chez le chat doit être précoce pour être efficace (*Bourdeau P., 1993*) et de longue durée.

Le traitement de la toxoplasmose aiguë peut prévenir la formation de kystes en détruisant les formes exentérales du toxoplasme (*Euzeby J., 1998*).

*La ***spiramycine*** (macrolide), est très active sur les tachyzoïtes et peut être associée à la *pyriméthamine* ayant une action synergisante (mais parfois mal tolérée chez le chat) ou avec la *sulfadiazine* (*Euzeby J., 1998*). Il semble que son action favorise le passage des tachyzoïtes aux bradyzoïtes (*Bourdeau P., 1993*). L'administration de *spiramycine* se fait à la posologie de 50 à 75 mg/kg pendant plusieurs semaines (*Bourdeau P., 1993*).

*La ***clindamycine*** (famille des lincosamides) semble être le médicament le plus efficace. Elle traverse la barrière hémato-encéphalique chez le chat. La posologie *per os* est de 25 mg/j en 2 ou 3

prises, pendant 4 semaines (*Lappin M.R, 1999)*. Généralement les signes cliniques rétrocèdent 2 à 3 jours après le début du traitement (sauf pour les signes oculaires et neurologiques).

*L'association ***sulfamides-pyriméthamine,*** à la dose de 15 mg/kg per os 2 fois par jour, permet d'obtenir une amélioration clinique mais entraîne toujours des effets indésirables (*Lappin M.R, 1999)*. Les ***sulfamides*** (*sulfadiazine, sulfadimérazine, sulfaméthazine, sulfaméthoxine*…) sont efficaces en phase aiguë mais peuvent être mal tolérés. La ***pyriméthamine*** a une action antifolinique, ses effets secondaires (anémie, thrombocytopénie, neutropénie) sont contrebalancés par des injections d'acide folinique en intramusculaire, ou par l'ajout de levure de bière dans l'alimentation (*Bourdeau P., 1993*). L'association de ces 2 molécules permet d'obtenir une meilleur efficacité du fait d'une action synergique sur le métabolisme de l'acide para-aminobenzoïque et de l'acide folinique (*Bourdeau P., 1993*).

Par contre, on observe à présent des chimiorésistances à la *clindamycine*, la *spiramycine* et aux *sulfamides* certaines étant croisées et plurivalentes. De plus, les molécules dont on dispose aujourd'hui sont actives uniquement contre les tachyzoïtes libres ou au sein de pseudokystes mais la destruction des kystes n'est possible qu'avec une unique molécule : l'***atovaquone*** (*AFSSA, 2005*).

En pratique, un traitement contre la toxoplasmose est rarement mis en place chez le chat car celui-ci est le plus souvent asymptomatique, et la découverte d'une sérologie positive a lieu au cours de la phase chronique de l'infection.

B. Epidémiologie de la toxoplasmose féline

1. Prévalence humaine et présence de félidés

Dans les zones tropicales à climat humide, où le teniasis et la trichinellose sont monnaie courante, la viande est généralement consommée très cuite et les ookystes excrétés par les félidés sont donc la cause majeure de transmission de la toxoplasmose humaine.
Dans les pays à haut niveau de vie, la contamination est surtout liée à la consommation de viande crue. C'est le cas en France, où la viande est facilement consommée peu cuite (*Dupouy-Camet J. et al., 1993*).

La toxoplasmose est plus fréquente dans les régions d'origine du chat (Europe, Afrique). La prévalence de la toxoplasmose est par exemple très basse en Australie, continent où le chat n'existait pas avant son introduction par les européens. De plus, dans certains atolls du Pacifique, l'introduction de chats a été suivie de l'apparition de toxoplasmose humaine (*Dupouy-Camet J. et al., 1993*).

Dans tous les pays, la prévalence sérologique augmente avec l'âge, mais son niveau dépend surtout des coutumes alimentaires et de la présence de félidés dans l'environnement. La caractérisation d'antigènes spécifiques de stades permettra peut-être, à l'avenir, de différencier par une réaction sérologique ces 2 modes de contamination : contamination par des kystes ingérés dans la viande ou contamination par des ookystes excrétés par le chat (*Dupouy-Camet J. et al., 1993*).

Dans tous les cas, on ne peut nier la relation de cause à effet qui existe entre la présence du chat et l'existence et la persistance de toxoplasmose humaine.

2. Prévalence féline

2.1. Séroprévalence

Les résultats des études de prévalence (sérologiques ou parasitologiques) sont difficilement comparables entre eux du fait des différences de méthodes utilisées, de la diversité des animaux inclus dans les études (état de santé, mode de vie et alimentation) et des différences de climats entre les pays où les enquêtes ont été réalisées. Il faut émettre quelques réserves quant à l'interprétation des résultats sérologiques car des réactions croisées sont possibles avec *Hammondia hammondi* (*Riahi H. et al., 1998*) et il semblerait que certains chats ne développent qu'une antigènémie sans produire d'IgG, ils échappent donc au dépistage (*Lappin M.R. et al., 1989*).

La séropositivité augmente avec l'âge des chats, la plupart étant séropositifs après le sevrage. La prévalence de l'infection par *Toxoplasma gondii* varie selon le style de vie du chat (*tableau 1*), les chats sauvages, qui chassent, étant plus fréquemment séropositifs que les chats domestiques (*Dubey J.P., 1988*).

Tableau 1: Prévalence de la toxoplasmose chez le chat dans le monde en fonction du mode de vie (AFSSA, 2005).

Pays	Mode de vie	Seroprévalence (%)	Référence
Allemagne- Hannovre	Chats errants	55	Tenter, 1994
USA- Washington State	Chats errants	41	Ladiges, 1982
Pologne- Wroclaw	Abandonnés	50	Smielewska-los, 2002
	Vivant en refuge	55	
USA- Washington State	Chats abandonnés	28	Ladiges, 1982
Pologne- Wroclaw	Chat de compagnie	51,8	Smielewska-los, 2002
Allemagne- Hannovre	Chat de compagnie ne sortant pas	32	Tenter, 1994
Argentine-Buenos Aires	Vivant en groupe	32	Fernandez, 1995
	Vivant seul	13,8	
	Présence d'un bac à déjections	19	
	Pas de bac à déjections	19,7	
Pologne- Wroclaw	Aliment industriel	19,3	Smielewska-los, 2002
	Viande crue	69,2	
Argentine-Buenos Aires	Aliment industriel	20	Fernandez, 1995
	Chasseur	48	
	Non chasseur	14	
	Viande crue	19,3	

Le mode de vie du chat influe donc de manière importante sur la séroprévalence toxoplasmique. Les facteurs prédisposants clairement identifiables sont la vie à l'extérieur, l'alimentation (aliments issus de la chasse, viande crue) et la vie en groupe.

Tenter avait recensé les séroprévalences de l'infection à *Toxoplasma gondii* chez les chats dans le monde de 1990 à 2000 *(Tenter A.M. et al., 2000)*. La prévalence observée est très variable suivant les pays *(voir Annexe 4)*:

-chez les chats domestiques, elle est comprise entre 7% à Singapour et 71% au Mexique,

-chez les chats sauvages ou errants, elle est comprise entre 11% au Japon et 73% au Brésil.

Les taux observés sont significativement plus faibles dans les pays asiatiques par rapport à l'Europe, l'Amérique du sud ou les Etats-Unis. En France, la séroprévalence obtenue dans deux études antérieures à 1998 était de 43% *(Tenter A.M. et al., 2000)*.

Ces données sont difficilement interprétables car les disparités internationales observées sont d'origine plurifactorielle. La proportion de chats errants par rapport aux chats domestiques, la prédominance de zones urbaines ou rurales, l'importance de la population de rongeurs, les variations climatiques (influant sur la sporulation des ookystes et leur persistance dans l'environnement) en fonction de la situation géographique mais aussi de la saison à laquelle l'étude a été réalisée…sont autant de facteurs pouvant influer sur la séroprévalence féline.

Dix-sept espèces de félidés sauvages capables d'émettre des ookystes de *Toxoplasma gondii* ont été répertoriées (*Tenter et al., 2000*). Les études disponibles montrent des séroprévalences comprises entre 9% et 100% *(AFSSA, 2005) (tableau 2).*

Tableau 2: Prévalence sérologique chez les félidés sauvages dans le monde (AFSSA, 2005).

Pays	Espèce étudiée	Nom vernaculaire	Nb étudié	Séroprévalence (%)	Références
Brésil*	Toutes espèces		865	54,6	Silva, 2001
	Herpailurus yagouaroundi	Jaguarundis	99	45,9	
	Leopardus pardalis	Ocelots	168	57,7	
	Leopardus tigrinus	Oncillas	131	51,9	
	Leopardus wiedii	Margays	63	55,5	
	Oncifelis colocolo	Pampas cats	8	12,5	
	Oncifelis geoffroyi	Geoffroy cats	12	75	
	Panthera onca	Jaguars	212	63,2	
	Puma concolor	Pumas	172	48,2	
Canada	*Felis concolor vancouverensis*	Cougar	12	92	Aramini, 1998
Grande Bretagne	*Felis sylvestris catus*	Chat sauvage d'Europe	ND	62	Yamaguchi, 1996
Grande Bretagne	*Felis sylvestris*	Chat sauvage d'Europe	42	100	McOrist, 1992
Etats-Unis-Colorado	*Otocolobus felis manul*	Pallas cat	16	100	Kenny, 2002
Etats-Unis-Floride	*Felis concolor coryi*	Panthère de Floride	38	9	

** = animaux vivants en zoo.*

La séroprévalence des félidés sauvages apparaît très élevée dans certaines régions du monde. Ils sont donc sans doute une source majeure de contamination indirecte des autres animaux homéothermes et de l'homme dans ces zones géographiques par les ookystes qu'ils excrètent. Une prophylaxie de type vaccinale, ayant justement pour but d'enrayer l'excrétion d'ookystes pourrait y être d'un grand intérêt.

2.2. Prévalence de l'excrétion d'ookystes

Concernant la recherche d'ookystes dans les matières fécales, les études publiées fournissent peu de renseignements fiables car l'élimination ookystale est transitoire, et la mise en évidence des ookystes très aléatoire. D'autre part, les ookystes de *Toxoplasma gondii* ne peuvent pas être différenciés en microscopie optique (*AFSSA, 2005*).

Sur 13 études regroupant plus de 7000 examens microscopiques des fèces, le pourcentage de chats éliminant des ookystes de *Toxoplasma gondii* est en général inférieur à 1% (*tableau 3*).

Tableau 3: Etude de la présence d'ookystes de Toxoplasma gondii dans les matières fécales du chat dans le monde (AFSSA, 2005).

Pays	Nb étudié	Nb positifs	Prévalence (%)	Référence
Examen microscopique				
Allemagne 1984-1991	1147	7	0,6	Epe, 1993
Allemagne 1998-2002	441	3**	0,7	Epe, 2004
Allemagne 1999-2002	3167	35*	1,1	Barutzki, 2003
Belgique	30	0	0	Vanparijs, 1991
Hollande	305	1	0,3	Robben, 2004
Czech Brno	620	8	1,29	Svobodova, 1986
Liban- Beyrouth	313	31	9,9	Deeb, 1985
Taiwan	117	0	0	Lin, 1990
Canada- San Mateo	107	6	5,6	MacNight, 1992
USA Maryland	650	3	0,5	Childs, 1986
USA Washington State	73	0	0	Ladiges, 1982
Australie	71	1	0	Collins, 1983
USA Illinois, 1975-76	217	2***	1	Guterbock, 1977

**Toxoplasma/Hammondia*

***Toxoplasma like oocystes*

****Toxoplasma ou Besnoitia*

La particularité du chat (et des félidés en général) en tant qu'hôte définitif, est qu'il assure la dissémination d'une forme infectante : l'ookyste, issue de la reproduction sexuée du parasite, et tient donc une place primordiale dans le cycle épidémiologique. Il est la seule source de contamination de l'environnement. Une bonne compréhension des particularités de l'excrétion d'ookystes semble donc nécessaire à l'évaluation du rôle du chat dans la transmission du parasite.

C. Le chat, hôte définitif, excréteur d'ookystes

Le chat contracte essentiellement la coccidiose toxoplasmique par carnivorisme. Il ne devient donc excréteur d'ookystes que lorsqu'il atteint un âge où il commence à se nourrir de produits carnés (environ à un mois et demi). Les chatons sont de plus protégés jusqu'à 8 à 12 semaines par une immunité passive transmise par la mère (passage d'IgG dans le colostrum ou par voie transplacentaire). Une condition pour que le chat soit exposé à l'infection est donc qu'il se nourrisse par prédation ou qu'il soit alimenté avec de la viande ou des abats crus (les aliments industriels, stérilisés, sont non infectants).

La chronologie de l'élimination des ookystes dans les fèces varie avec la nature des stades parasitaires infectant le chat et celui-ci excrète des ookystes **de manière transitoire** pendant toute la période

patente de la coccidiose toxoplasmique (environ **7 à 20 jours**) (*AFSSA, 2005*). Pendant cette période, il élimine des millions d'ookystes qu'il disperse sur un rayon de **1,5 à 3,5 km** (*Euzeby J., 1998*).

1. Excrétion d'ookystes lors de contamination par ingestion de bradyzoïtes

Il s'agit, comme vu précédemment, d'une contamination par carnivorisme (cycle HI-HD ou dixène).
Les ookystes sont excrétés dans les fèces **3 à 10 jours** après l'infection par des bradyzoïtes contenus dans des kystes musculaires (*Davis S.W. et al., 1995*). L'élimination se poursuit environ 20 jours. L'intensité de cette élimination est variable : dans une étude menée au sein d'une ferme produisant des porcs dans le Massachusetts, des chats nourris avec cette viande de porc ont éliminé au total de 25 à 810 millions d'ookystes (*Dubey J.P. et al., 2002*). Même après absorption d'un seul bradyzoïte de la souche VEG, le chat peut produire des millions d'ookystes (*Dubey J.P.,2001*).

2. Contamination lors d'ingestion de tachyzoïtes

L'ingestion d'une proie en phase aiguë de toxoplasmose peut entraîner la contamination du chat par des tachyzoïtes. Dans ce cas, le délai d'apparition des ookystes dans les fèces est de **15 à 19 jours** et la durée d'excrétion est de 7 à 19 jours. L'excrétion peut atteindre 360 millions d'ookystes par jour (*Tenter A.M. et al., 2000*; *Dubey J.P., 2002b*).

3. Contamination lors d'ingestion d'ookystes

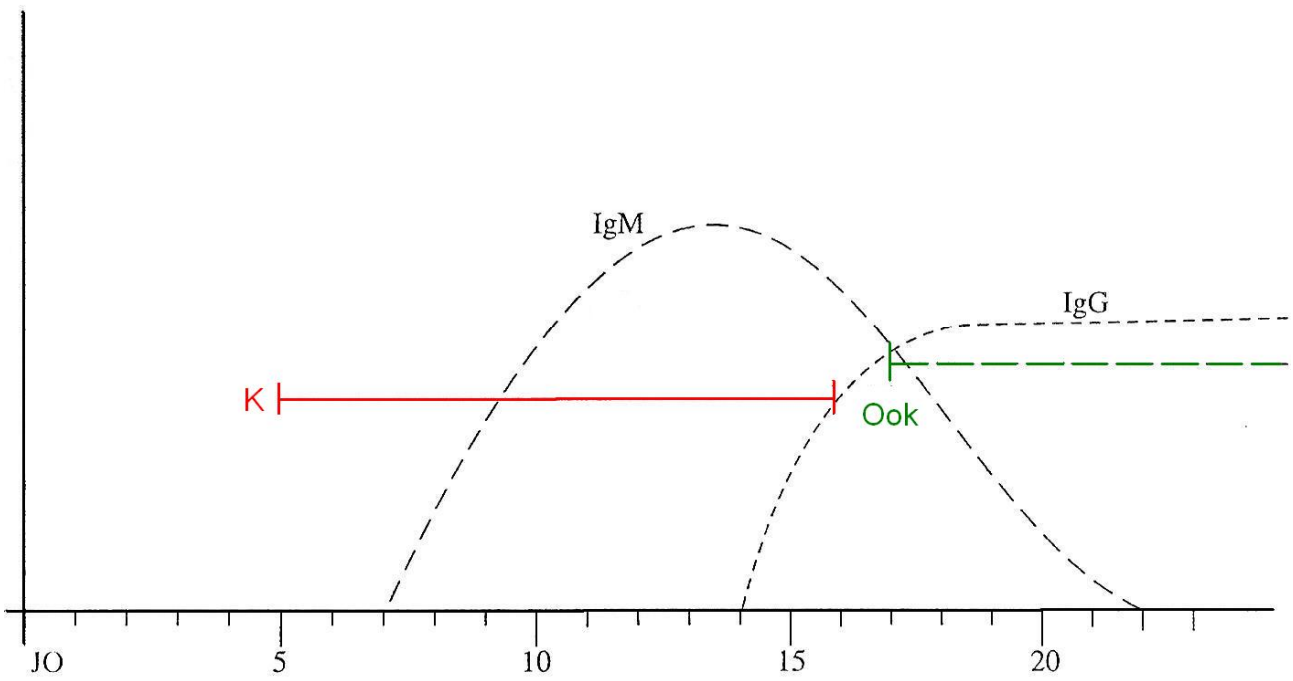
Si le chat a été contaminé par absorption d'ookystes sporulés (cycle HD-HD ou monoxène), la période prépatente d'excrétion des ookystes est de **15 à 20 jours** et l'élimination se poursuit pendant 10 jours. Mais d'après Blewet (*Blewet D.A. et Watson W.A., 1983*), seul 20% des chats ingérant des ookystes en ré-excrètent par la suite dans leur matière fécale. La dose infectante dans ce cas est élevée : 45% des chats s'infestent avec 1000 ookystes, aucun ne s'infecte avec 1 à 10 ookystes (*Dubey J.P., 1996*).

4. Chronologie différentielle de l'excrétion des ookystes et de la sérologie selon le mode d'infection

Selon le mode d'infection du chat, la chronologie de l'évacuation des ookystes et de l'apparition des anticorps diffère (*figure 7*):
-en cas d'infection du chat par des ookystes sporulés (Ook), les anticorps (IgG, IgM) sont décelables avant que ne soient éliminés les ookystes (car les sporozoïtes doivent subir une évolution exentérale avant que ne s'établisse la localisation coccidienne dans les entérocytes),

-en cas d'infection du chat par des kystes à bradyzoïtes (K), la période prépatente est plus courte et les ookystes sont alors décelables plus tôt que les anticorps (entre le 3ème et le 10ème jour post infection, *Davis S.W. et Dubey J.P., 1995*).

Figure 10: Chronologie différentielle de l'excrétion d'ookystes et de la sérologie chez le chat selon le mode d'infection. (D'après Euzeby J., 1998).



Légende:

***-Ook**: infection par des ookystes sporulés à J0*

***-K**: infection par des kystes à bradyzoïtes à J0*

Dans tous les cas, l'élimination des ookystes est très brève, tandis que la persistance des anticorps est plus longue (3 à 5 mois pour les IgM, plus de 2 ans pour les IgG) (*Euzeby J., 1998*). Ceci met à nouveau l'accent sur le faible intérêt diagnostique de l'examen coproscopique.

5. L'excrétion d'ookystes lors de réinfection et de réactivation

Une fois l'animal immunisé, les parasites de réinfection potentiellement rencontrés sont normalement neutralisés. Les chats de plus de 4 à 5 mois ne sont donc théoriquement plus sources d'ookystes. Cependant, des ré-excrétions ont déjà été constatées plusieurs années (6 ans) après l'infection primaire (*Dubey J.P., 1995)*. Par ailleurs, des reprises d'élimination sont possibles lors de réinfections par d'autres coccidies (*Isospora rivolta*, *Isospora felis*) ou à la suite de corticothérapies (*Tenter et al.,*

2000). Par contre, aucune réexcrétion d'ookystes toxoplasmiques associée à une infection par un rétrovirus n'a été décrite chez le chat, et lors de primo-infection, l'excrétion d'ookystes n'est ni plus longue, ni plus importante chez un chat infecté par le FIV ou le FeLV (*Lin D.S.et al., 1992*).

En règle générale, la coccidiose toxoplasmique est une infection ipsostérilisante : après la période patente, l'animal ne dissémine plus de parasites (*Euzeby J., 1998*). L'excrétion des ookystes ne se produit donc que pendant une courte période mais elle est très productive. On estime que 1% des chats sont excréteurs d'ookystes à un instant *t* donné (*AFSSA, 2005*) mais il est malheureusement particulièrement difficile d'identifier le moment où un chat est excréteur car les signes cliniques sont plus fréquents lors de toxoplasmose extra-intestinale que lors de cycle entéro-épithélial et généralement, la forme extra-intestinale ne s'accompagne pas d'excrétion d'ookystes.

Au final, le chat est responsable d'une contamination environnementale en disséminant des ookystes irrégulièrement mais en très grande quantité, c'est ce qui signe sa particularité dans le cycle complexe du parasite. Or ces ookystes sont résistants et peuvent rester infectants très longuement dans l'environnement (jusqu'à 18 mois dans certaines conditions, *Frenkel J.K.et al., 1975*) (voir *Annexe 2*). Mc Colgan estime qu'un chat infecté défèquant dans 10 tonnes de céréales y dépose parfois près de 10 000 000 ookystes *(Mc Colgan C. et al., 1988*) . Chaque kilogramme de grain peut être le véhicule de 5 à 25 doses infectantes par mouton. Ceci conforte l'opinion de Skjerve, qui affirme que la présence journalière de chatons dans une bergerie est le principal facteur de risque associé à une prévalence élevée dans les élevages de moutons (*Skjerve E. et al., 1998*). Les chats vivant à proximité des zones d'élevage d'animaux de boucheries seraient donc la source indirecte principale de contamination de l'homme. Il pourrait bien s'agir d'une population cible intéressante pour une campagne de vaccination à grande échelle…

La toxoplasmose présente une clinique peu évocatrice chez le chat et son diagnostic, en plus d'être difficile, ne permet pas de prédire à quel moment le chat va représenter un risque pour l'homme (c'est-à-dire à quel moment il est excrèteur d'ookystes) puisque l'excrétion est de courte durée et la phase intestinale le plus souvent asymptomatique. Même s'il était possible d'accéder à cette information, quelles mesures devraient être prises ? L'euthanasie de l'animal excréteur, son isolement… ? La solution la plus radicale et la plus efficace serait d'empêcher totalement cette excrétion d'ookystes chez les félins. Aux vues de l'épidémiologie de cette zoonose mondialement répandue et de l'immunité naturelle qu'elle suscite chez l'hôte, la vaccination des chats reste la solution la plus séduisante car elle permet justement de s'attaquer directement à la source du problème.

De plus, la prophylaxie sanitaire de la toxoplasmose est difficile chez le chat étant donné le comportement alimentaire naturel de ce dernier : limitation des sorties et de la prédation, alimentation industrielle, contrôle de la population de rongeurs autour du domicile… Les mesures à prendre vis-à-vis des chats sauvages, plus souvent porteurs du parasite (capture, stérilisation…) sont quasiment impossibles à mettre en œuvre. Enfin, aucune chimioprévention valable n'est disponible : si la *sulfadimidine*, la *framycétine*, la *mépacrine* et les *tétracyclines* semblent efficaces pour détruire les formes schizogoniques du toxoplasme et ainsi prévenir la formation des éléments sexués (*Euzeby J., 1998*), ceci impliquerait la pratique d'une antibiothérapie lourde et de longue durée (voire à vie) chez les animaux ciblés.
Autant d'arguments qui confortent un projet de mise en place d'une prophylaxie vaccinale féline contre *Toxoplasma gondii*.

III. LA VACCINATION ANTI-TOXOPLASMIQUE FELINE

La vaccination des chats semble être un moyen sûr de combattre la toxoplasmose, et en ce qui concerne la prophylaxie de la toxoplasmose congénitale chez l'homme, le moyen le plus économique (*Euzeby J., 1998*). Cependant, la question de l'intérêt réel de sa mise en place se pose car les mesures d'hygiène permettant de limiter une contamination alimentaire chez l'homme sont simples à appliquer et ont permis en 50 ans une nette diminution de la séroprévalence humaine en France. Dans les premières études réalisées par Desmonts en région parisienne dans les années 1960, la séroprévalence était de 84% (*AFSSA, 2005*) ; dans la première étude nationale réalisée en 1982, elle est de 66% (*AFSSA, 2005*), dans l'Enquête Nationale Périnatale de 2003, la séroprévalence globale est estimée à 44% (*Berger F., 2005*).

De plus, la contamination de l'homme par contact direct avec un chat excréteur d'ookystes est très peu probable : les ookystes ne sont pas immédiatement infectants (ils doivent préalablement sporuler dans le milieu extérieur, en plusieurs jours selon les conditions de température et d'humidité). Il faudrait donc, pour qu'un chat contamine un homme par contact, que le chat, au cours de sa toilette, répande des ookystes sur sa fourrure, que ces ookystes y restent assez longtemps et dans des conditions favorables pour sporuler, que les caresses effectuées sur le pelage souillent les doigts et que l'homme porte ensuite ses doigts à sa bouche (*Euzeby J., 1998*). Le chat contamine donc l'environnement et ses denrées alimentaires, cibles des précautions prises à l'heure actuelle, mais le risque qu'un simple contact soit contaminant est infime. Alors, faut-il vacciner le chat ou suffit-il d'appliquer drastiquement les mesures d'hygiène préconisées ?

Malgré tout, ces mesures de prévention ne constituent pas un bouclier parfaitement fiable contre l'infection puisqu'elles préviennent les conséquences et non la cause de la dissémination parasitaire : l'excrétion d'ookystes par le chat.

De plus, plusieurs études ont fait cas d'infections toxoplasmiques humaines en masse par contamination des eaux au Canada (*Bowie W.R. et al., 1997*) et au Brésil (*Bahia-Oliveira L.M.et al., 2003*). Des cas de mortalité aiguë chez des mammifères marins par contamination des océans ont aussi été rapportés (*Dubey J.P.et al., 2003; Conrad P.A.et al., 2005*). Ces évènements confortent l'utilité d'une vaccination féline, qui permettrait de prévenir la contamination de l'environnement et l'infection des nombreux hôtes intermédiaires à grande échelle.

Pour être efficace, la vaccination du chat, devrait donc être pratiquée sur une très large population de félins, domestiques et sauvages, et préférentiellement sur de très jeunes animaux, avant que ne survienne la contamination naturelle. Puisque le chat ne semble pas être source d'infection par simple contact, on peut s'interroger par contre sur l'intérêt de la vaccination des chats domestiques en zone urbaine. La population féline cible serait donc plutôt constituée par les chats de ferme, vivant près des zones d'exploitation des terres ou d'élevage du bétail, qui contaminent les denrées alimentaires destinées à l'homme

L'organisation et la mise en œuvre d'une telle campagne paraît difficile, mais pas impossible : on garde en mémoire l'efficacité de la vaccination orale menée contre la rage chez le renard, ayant permis d'éliminer le réservoir sauvage de cette zoonose de vastes zones européennes et à la France de retrouver un statut indemne en 2001 (vaccination avec un vaccin vectorisé : virus de la vaccine réplicatif porteur du gène de la glycoprotéine G du virus rabique) (*Brochier B.et al., 1991*).
Une grande partie du problème réside dans la qualité de l'outil vaccinal à utiliser et le choix de la population à vacciner, car vacciner tous les chats semble illusoire.

A. Objectifs et principes de la vaccination anti-toxoplasmique

Un vaccin se définit comme une préparation qui, après administration, induit une réaction immunitaire spécifique responsable d'une protection contre une maladie infectieuse, parasitaire ou tumorale.

1. Objectifs de la vaccination anti-toxoplasme et problématique vaccinale

1.1. Objectifs vaccinaux

Le concept global de vaccination contre *Toxoplasma gondii* intègre trois objectifs complémentaires, visant trois polulations différentes (les femmes enceintes séronégatives, les animaux de rente et les chats). Ces trois objectifs sont :
- réduire l'excrétion d'ookystes chez le chat afin de limiter la contamination environnementale et le risque d'infection pour tous les hôtes intermédiaires,
-prévenir la formation de kystes chez les animaux destinés à la consommation (pour éviter la transmission à l'homme et aux autres animaux),
-empêcher l'apparition d'une parasitémie chez la femme enceinte et les femelles en élevage (brebis surtout) pour éviter une transmission transplacentaire du parasite au fœtus et une toxoplasmose congénitale.

Nous nous intéressons ici au premier objectif : la vaccination féline. L'outil vaccinal devra répondre à plusieurs exigences théoriques afin d'atteindre au mieux cet objectif pratique.

Nous avons déjà vu, à l'occasion de la seconde partie, l'importance de la réponse immune de type Th1 dans la protection contre l'infection par *Toxoplasma gondii (Denkers E.Y. et Gazzinelli R.T., 1998)*. Le vaccin candidat devra donc induire une forte réponse lymphocytaire T (CD8+ spécifiques notamment). Pour ce faire, une présentation du ou des antigènes vaccinaux par les cellules dendritiques est nécessaire.
Le vaccin candidat devra également être à l'origine d'une bonne réponse humorale au niveau intestinal : les IgA sécrétées par les plasmocytes de la muqueuse intestinale jouent en effet un premier rôle de barrière contre l'infection toxoplasmique (*Chardès T. et Bout D., 1993*).
La nature et la dose de l'antigène, la nature de l'adjuvant et du vecteur, ainsi que le mode d'administration du vaccin seront des facteurs primordiaux à étudier pour que les conditions précitées soient remplies.

Enfin, il serait intéressant que les antigènes vaccinaux choisis puissent être différentiables des antigènes naturels afin que la vaccination n'interfère pas avec les tests de dépistage.

1.2. Problématique vaccinale

Mettre au point des vaccins contre des parasites est délicat car ceux-ci stimulent souvent plusieurs types de réponses immunes (humorales et cellulaires) envers différents antigènes, toutes ne permettant pas l'acquisition d'une immunité protectrice. Or l'objectif dans le cadre de la vaccination anti-toxoplasme, est d'obtenir avant tout une réponse cellulaire (Th1), comme vu précédemment.

Le cycle parasitaire de *Toxoplasma gondii* est complexe, au cours de ce cycle s'expriment de nombreux épitopes antigéniques communs ou stade-dépendants, or l'immunisation d'un animal contre un stade parasitaire ne protège pas contre une infection par un stade différent. Pour ces raisons, une vaccination multiantigénique, comprenant des antigènes des différents stades parasitaires semble un choix pertinent. Le défi majeur dans la conception de nouveaux vaccins est de sélectionner les antigènes appropriés, et de les présenter au système immunitaire de telle façon qu'ils provoquent une réponse protectrice.

La multiplicité des hôtes intermédiaires possibles et le fait que la réponse immune induite dépende en partie de l'hôte complique encore la problématique vaccinale. Un vaccin animal a déjà été commercialisé pour les ovins mais chez l'homme, le vaccin reste à l'état d'ébauche car l'immunisation

par des parasites atténués n'est pas applicable du fait du risque de mutation pouvant restituer la virulence du parasite. Les vaccins vivants posent des problèmes de sécurité, mais aussi de durée de conservation et de production à grande échelle.

La mise au point d'un vaccin efficace contre *Toxoplasma gondii* nécessitera donc d'atteindre un maximum d'objectifs, tout en palliant aux difficultés techniques posées par ce protozoaire complexe.

2. Antigènes de *Toxoplasma gondii*

Des variations génotypiques ont permis d'identifier différentes souches de *Toxoplasma gondii.* Les différences phénotypiques qui en découlent (nature des constituants membranaires, équipement enzymatique…) sont à l'origine de variations antigéniques. *Toxoplasma gondii* est une véritable mosaïque antigénique de milliers de molécules dont un petit nombre est actuellement connu.
On distingue des antigènes somatiques (membranaires et cytoplasmiques) et des antigènes métaboliques (sécrétés puis excrétés par le parasite). Selon la souche et selon le stade évolutif de *Toxoplasma gondii,* les molécules exprimées (surtout membranaires) peuvent être très différentes.

2.1. Variation de la structure antigénique en fonction du stade évolutif

Les sporozoïtes, les tachyzoïtes et les bradyzoïtes n'ont pas la même structure antigénique, certains antigènes étant spécifiques de stade, d'autres présents chez tous les stades (*tableau 4*). Il semble d'ailleurs qu'une immunisation contre l'ensemble des stades parasitaires soit préférable pour une meilleure efficacité vaccinale.

Tableau 4: Divers antigènes de Toxoplasma gondii utilisés dans les études vaccinales et spécificités de stades

<table>
<tr><th></th><th>Stade sporozoïte</th><th>Stade tachyzoïte</th><th>Stade bradyzoïte</th></tr>
<tr><td>Antigènes spécifiques de stades</td><td></td><td>-P30 (SAG1) (antigène membranaire)
-HSP70 (protéine de choc thermique)</td><td>-MAG1 (antigène spécifique des kystes à bradyzoïtes)
-HSP30 (BAG1)</td></tr>
<tr><td rowspan="2">Antigènes communs à plusieurs stades</td><td></td><td colspan="2">-SAG3 (antigène membranaire)
-GRA1,2,4,5,6,7 (antigènes cytoplasmiques)</td></tr>
<tr><td colspan="3">-ROP2 (antigène de rhoptrie)
-MIC 2,3,4 (antigènes de micronème)</td></tr>
</table>

2.2. Caractéristiques des différents antigènes de Toxoplasma gondii

▪Antigènes somatiques

******Antigènes membranaires* (= antigènes de surface ou pariétaux)

Ces antigènes sont surtout de nature glycoprotéique. Les molécules de surface les plus importantes identifiées sont :

✓**P30** (PM=30kD) = **SAG1**, c'est la protéine membranaire majeure, la plus abondante. Elle représente 5% des protéines totales de surface de *Toxoplasma gondii,* elle est spécifique du stade tachyzoïte et très immunogène. Elle induit une réponse immunitaire humorale et cellulaire rapide et efficace au cours de la phase d'infection active (multiplication tachyzoïtique du parasite). Cette protéine servirait de ligand entre *Toxoplasma gondii* et un récepteur membranaire de la cellule-hôte (les tachyzoïtes la rejettent lors de leur pénétration dans la cellule hôte). L'utilisation d'un anticorps monoclonal anti-P30 bloque la pénétration du tachyzoïte dans la cellule (*Kasper L.H.et Khan I.A., 1993*). Cette protéine est utilisée dans de nombreuses méthodes de sérodiagnostic et son utilisation vaccinale est prometteuse.

✓**P43** (PM=43kD) = **SAG 3,** antigène commun aux tachyzoïtes et aux bradyzoïtes.

✓D'autres polypeptides dont **P22**=**SAG2** sont aussi connus, ils jouent un rôle dans la pénétration des parasites par endocytose. Les anticorps dont ils sollicitent l'élaboration ont un effet protecteur et on les utilise donc aussi dans les méthodes diagnostiques.

✓**MAG 1** = antigène spécifique des kystes tissulaires

L'antigène natif MAG 1 est une protéine de 65 kDa localisée dans la matrice et la paroi des kystes à bradyzoïtes. Cet antigène est abondamment exprimé dans les kystes mais n'a pas été décelé dans les pseudokystes (ni dans les tachyzoïtes, ni dans la vacuole parasitophore qui les entoure) (*Parmley S.F. et al., 1994*).

******Antigènes cytoplasmiques*

Les antigènes cytoplasmiques jouent également un rôle important dans la stimulation de la réponse immune protectrice. Ceux-ci sont exprimés à la fois par les tachyzoïtes et les bradyzoïtes. Les composants antigéniques majeurs sont les molécules GRA : GRA 1 (23 kDa), GRA 2 (28,5 kDa), GRA 4 (40 kDa), GRA 5 (21 kDa), GRA 6 (32 kDa) et GRA 7 (29 kDa). Ce sont de bons candidats au

vaccin, notamment **GRA1**, protéine de liaison au Calcium, et **GRA2** (qui contient de multiples épitopes B) (*Cesbron-Delauw M.F. et Capron A., 1993*).

▪**Antigènes métaboliques** (exoantigènes ou antigènes d'excrétion-sécrétion : antigènes « ES »)

Ils constituent la majorité des antigènes circulants (90%) détectables au début de l'infection ; ils semblent induire une stimulation lymphocytaire plus importante que les antigènes somatiques (*Cesbron-Delauw M.F. et Capron A., 1993*). Les exoantigènes sécrétés par les bradyzoïtes sont le facteur essentiel de l'entretien de l'immunité au cours de la phase latente chronique. Ils sont produits par les rhoptries et les micronèmes.

**Les antigènes de rhoptries*

Le rôle biologique des rhoptries (participation à la pénétration des cellules hôtes par le parasite) est primordial et elles ont un rôle majeur dans la virulence de la souche parasitaire (*Dlugonska H., 2008*). Ce sont donc des antigènes candidats à la vaccination.

L'antigène **ROP2** (54 kDa), exprimé par les tachyzoïtes, les bradyzoïtes et les sporozoïtes, est à l'étude pour son utilisation éventuelle dans un vaccin (*Leyva R. et al., 2001*).

La protéine **ROP18**, décrite comme un élément majeur de la pathogénicité de *Toxoplasma gondii*, semble avoir un avenir prometteur dans la vaccination anti-toxoplasmique. Néanmoins, cette protéine présente un polymorphisme important (il s'agit d'une protéine kinase hypervariable responsable de la forte virulence de certaines souches parasitaires) (*Dlugonska H., 2008*).

La protéine **ROP1** a également été utilisée dans des essais vaccinaux (*Guo H. et al., 2001*).

Les protéines de choc thermique (heat-shock protein) :* **HSP70 et **HSP30**

Les protéines de choc thermique présentent des peptides antigéniques interagissant avec les CPA et stimulant leur sécrétion de cytokines, elles permettent aussi la maturation des DC.

✓**HSP70** est un antigène spécifique des tachyzoïtes et un des facteurs de la virulence du parasite. Elle diminue les défenses immunitaires des souris infectées par *Toxoplasma gondii* en inhibant la production d'oxyde nitrique (NO) par les macrophages. Les effets de l'immunisation avec l'antigène HSP70 de *Toxoplasma gondii* persistent plus de 3 mois chez le modèle murin (*Mohamed R.M. et al., 2003*).

✓**HSP30** (**BAG 1**) est spécifiquement exprimée par les bradyzoïtes. Elle promeut la différenciation des tachyzoïtes en bradyzoïtes et protège le toxoplasme du stress environnemental. Il a été montré que la réponse cellulaire induite par l'antigène BAG1 est associée à la production d'IFN γ chez l'homme, ce qui en fait un candidat potentiel pour l'élaboration d'un vaccin humain (*Di Cristina M. et al., 2004*).

**Les antigènes de micronèmes*

Les antigènes de micronèmes (**MIC 2, 3, 4**) sont intéressants car ce sont des protéines qui interviennent dans le processus d'invasion des cellules hôtes et elles sont largement conservées parmi les parasites du phylum des Apicomplexa. De plus, ces protéines sont exprimées chez tous les stades infectieux de *Toxoplasma gondii* (tachyzoïte, bradyzoïte et sporozoïte).

.

**Autres exoantigènes*

✓Le **PEF** (Penetration Enhancing Factor = facteur favorisant la pénétration) est une hyaluronidase qui participe à la pénétration du tachyzoïte dans la cellule-hôte.

✓Certains antigènes somatiques (comme les antigènes cytoplasmiques GRA1, GRA2, GRA5) sont retrouvés dans les produits d'excrétion-sécrétion (*Cesbron-Delauw M.F.et Capron A., 1993*).

2.3. Les formes antigéniques utilisables : protéines, peptides ou ADN

▪Les vaccins protéiques

Ce sont des vaccins inertes sous-unitaires à base de protéines purifiées ou recombinantes très immunogènes d'un micro-organisme, correspondant souvent aux protéines de surface exposées naturellement au système immunitaire. Cependant, ils donnent une immunité très hétérogène et majoritairement humorale, d'où la nécessité de les adjuver (*Van Oirschot J.T. et al., 1997*).

▪Les vaccins peptidiques

Ces vaccins inertes, sous-unitaires, représentent l'aboutissement de la démarche réductionniste qui consiste à définir de plus en plus finement les cibles de la réponse immune, et donc les constituants

nécessaires d'un vaccin. Ne sont inclus dans ces vaccins que les peptides ou épitopes reconnus dans le cadre de la réponse immunitaire acquise par les lymphocytes B ou T. De manière à obtenir une immunogénicité correcte, ces peptides doivent le plus souvent être couplés à une protéine porteuse (comme l'ovalbumine) et être adjuvés (*Van Oirschot J.T. et al., 1997*).

▪La vaccination à ADN

**Principes* (*Kofta W., 2001*)

Le concept des vaccins à ADN a émergé dans les années 1990. Pour obtenir un vaccin à ADN, l'ARN parasitaire doit être extrait puis, par transcription inverse conjuguée avec une PCR, l'ADN codant pour un antigène potentiellement protecteur est amplifié. Par la suite, l'ADN antigénique est cloné dans un plasmide bactérien vecteur, sous le contrôle d'un promoteur eucaryote pour une expression optimale dans les cellules de l'individu vacciné. Le vecteur est alors administré à un organisme hôte (généralement par voie intra-musculaire ou intradermique), où la protéine codée confère une résistance après expression du gène cloné. L'action des vaccins à ADN semble dépendre des moyens de délivrance du vaccin, du type d'antigène codé, de la dose d'ADN et des séquences vectorielles d'ADN accompagnant le gène d'intérêt. Cette méthode de recherche s'avère prometteuse car elle réalise une présentation de l'antigène au système immunitaire proche de ce que l'on observe *in vivo*. Généralement, ce type de vaccination induit une réponse immune de type Th1. Cependant, les résultats vaccinaux dépendent fortement de la voie d'immunisation et les résultats des études sont souvent décevants, les vaccins ADN plasmidiques seuls s'avérant peu immunogènes (*AFSSA., 2005*).

**Avantages des vaccins à ADN* (*Smooker P.M. et al., 2004*)

Les vaccins à ADN sont sécuritaires: il n'y a pas de possibilité de réversion à la virulence comme c'est le cas pour les vaccins vivants atténués.

Leur efficacité, observée chez les petits animaux de laboratoire implique plusieurs facteurs :

-les protéines exprimées dans les cellules cibles subissent les mêmes modifications post-transcriptionelles que les protéines natives, ce qui n'a pas lieu lorsque les antigènes vaccinaux sont produits par des bactéries. Ceci permet une présentation de la protéine encodée par le CMH I, essentielle à l'activation des LTCD8+,

-l'ADN lui-même peut agir comme un adjuvant : la présence de séquences spécifiques d'ADN dans un vecteur peut augmenter l'efficacité vaccinale (co-expression de cytokines comme le GM-CSF ou l'IL12, de molécules de costimulation comme CTLA4, de motifs CpG…) (*Smooker P.M. et al., 2004*),

-les vaccins à ADN semblent permettre une bonne immunisation des jeunes : les protéines immunogènes sont directement produites dans la cellule hôte et ne sont donc pas neutralisées par les anticorps d'origine maternelle (*Horzinek M.C. et al., 1997 ; Tizard I.R., 2008*),

-la possibilité d'un transfert vertical d'immunité obtenu avec les vaccins à ADN a été montrée lors d'une étude menée sur des chèvres gestantes vaccinées par voie intranasale avec un plasmide recombinant encodant une protéine de surface de *Cryptosporidium parvum (Sagodira S. et al., 1999)*. Les chevreaux nés de mères vaccinées relarguaient quantitativement moins d'ookystes, et sur une période plus courte par rapport aux témoins.

L'utilisation de tels vaccins simplifie les processus de production et de distribution. En effet, il est relativement aisé de cloner un fragment d'ADN dans un vecteur approprié et d'obtenir une quantité considérable d'ADN. De plus, l'ADN est facile à manipuler, très stable et résistant à la chaleur, ce qui motive l'utilisation de ce type de vaccin dans les pays tropicaux où les vaccins vivants atténués ou protéiques nécessitaient pour leur transport le maintien d'une chaîne du froid. Les coûts de distribution étaient alors prohibitifs pour les pays en voie de développement.

Les vaccins à ADN, très sécuritaires, auraient pu convenir à des programmes d'immunisation en masse car leur production en grande quantité et leur conservation sont facilités, mais il existe malheureusement plusieurs facteurs limitants à ce type d'utilisation.

**Inconvénients des vaccins à ADN (Kofta W. et Wedrychowicz H., 2001)*

Le principe de la vaccination à ADN étant de faire pénétrer celui-ci directement à l'intérieur des cellules, l'administration par voie orale de ce type de vaccin est inenvisageable. Seule l'injection intra-musculaire, le « *gene gun* », et plus rarement l'inhalation intra-nasale sont utilisés, ce qui n'est pas en faveur d'une utilisation de ce type de vaccin pour la vaccination d'animaux sauvages à grande échelle.

Les résultats obtenus avec les vaccins à ADN sont très inconstants selon les formulations vaccinales, les doses, les espèces vaccinées et même les différentes souches au sein d'une même espèce. Concernant la vaccination antiparasitaire, le protozoaire le plus étudié dans le but d'élaborer des vaccins à ADN est le parasite *Plasmodium* sp. Des résultats encourageants ont été obtenus avec de petits animaux de laboratoire. Mais les mêmes types de vaccins utilisés pour immuniser les singes ou l'homme se sont révélés inefficaces, car induisant une réponse immune beaucoup trop faible, pour des raisons encore pas complètement élucidées. Une voie majeure d'investigation est donc le développement de stratégies afin d'augmenter l'efficacité des vaccins à ADN.

Enfin, il convient de souligner le risque de tels vaccins si le plasmide venait à s'intégrer à l'ADN de l'hôte et à activer des gènes oncogènes ou inhiber des gènes suppresseurs de tumeurs. On considère cependant que ce risque est faible (*Horzinek M.C. et al., 1997 ; Tizard I.R., 2008*).

De nombreux vaccins à ADN ont été élaborés cette dernière décennie contre *Toxoplasma gondii* (voir *Annexes 6 et 7*).

3. Vectorisation des antigènes de *Toxoplasma gondii*

Les vecteurs doivent favoriser l'entrée de l'antigène vaccinal dans la cellule. Les vaccins vectorisés sont des vaccins recombinants obtenus par manipulation du génome de vecteurs bactériens ou viraux, dans lesquels les gènes codant les protéines immunogènes d'un pathogène (ou transgène) sont insérés. Les salmonelles, listeria et colibacilles peuvent servir de vecteurs bactériens. Les principaux vecteurs viraux à l'étude sont les adénovirus, les poxvirus et les herpèsvirus. Ils suscitent des réponses immunitaires à la fois humorales et cellulaires contre les antigènes apportés (*Yokoyama N. et al., 1997*). Le choix d'un vecteur viral réplicatif ou non réplicatif repose sur un compromis entre la dose nécessaire à l'induction d'une immunité et les aspects de biosécurité, puisque les vecteurs non réplicatifs doivent souvent être utilisés à des doses plus élevées mais sont aussi plus sûrs en terme de diffusion.

3.1. Vecteurs viraux

▪Adénovirus

Les adénovirus peuvent être produits en grande quantité et la transduction peut se faire sur un large spectre de cellules cibles (cellules quiescentes ou en prolifération), par contre le transgène n'est pas exprimé de manière stable et les particules adénovirales sont très immunogènes d'où une efficacité thérapeutique décevante (les cellules transduites sont rapidement reconnues et éliminées par le système immunitaire) (*Yokoyama N. et al., 1997*).

Une étude a utilisé des adénovirus recombinants non réplicatifs codant pour 3 antigènes de surface génétiquement modifiés du toxoplasme : AdSAG1, AdSAG2 et AdSAG3 (*Caetano B.C. et al., 2006*). L'utilisation d'adénovirus recombinants dans des protocoles vaccinaux est réputée pour induire des réponses immunes cellulaires d'orientation Th1 et pour activer un grand nombre de $LTCD8^+$ spécifiques. Ces propriétés les ont rendus intéressants comme vecteurs vaccinaux contre la toxoplasmose.

L'immunisation de souris BALB/c avec ces vecteurs a permis d'obtenir des réponses humorale et cellulaire de type Th1. Mais aucune protection n'a été observée lors d'infection avec la souche RH, très virulente, de *Toxoplasma gondii,* ce qui montre que la réponse immune ne se développe pas aussi vite et de manière aussi intense que nécessaire pour contrôler la réplication tachyzoïtique. Par contre, une réduction significative du nombre de kystes cérébraux a été observée lors d'infection avec la souche P-Br.

▪**Poxvirus : MVA (Modified Vaccinia Ankara)**

Les poxvirus sont très utilisés en tant que vecteurs du fait de leur stabilité (plus de 10% de leur génome peut être délété et remplacé par des fragments d'ADN étranger sans altération de la viabilité du virus) et de la possibilité d'altérer leur capacité de réplication (Tizard I.R., 2008 ; Van Kampen K.R., 2001 ; Van Oirschot J.T. et al., 1997). Le MVA est une souche très atténuée du virus de la vaccine (Orthopoxvirus). Il a été utilisé comme vecteur de l'antigène métabolique ROP2 (protéine de rhoptrie) lors d'une étude d'immunisation de souris contre la toxoplasmose. Une production d'Ac anti-ROP2 a été mise en évidence, ainsi qu'une augmentation de la durée de vie des souris immunisées (*Roque-Resendiz J.L. et al., 2004*).

.

▪**Herpesvirus**

**PRV (Pseudorabies Virus)*

Le virus recombinant de la pseudorage exprimant l'antigène membranaire SAG1 (rPRV/SAG1) a été utilisé pour immuniser des souris *(Liu Q. et al., 2008*). Toutes les souris vaccinées ont développé une réponse immunitaire humorale et cellulaire de type Th1 ayant permis d'obtenir une protection partielle (60% de survie) lors d'une infection expérimentale avec la souche RH.

**FHV1 (Herpesvirus félin de type 1)*

L'herpesvirus félin de type 1 (FHV1) a été utilisé lors d'une étude de vaccination féline (*Mishima M. et al., 2002*) qui sera détaillée par la suite.

3.2. Vecteurs bactériens

Les vecteurs bactériens peuvent être produits en grande quantité, ils sont moins immunogènes que les vecteurs viraux et ils permettent la vectorisation de transgènes de plus grande taille (*Van Kampen K.R., 2001*).

▪**Le BCG** (*Wang H. et al., 2007*)

La séquence d'ADN de l'antigène de rhoptrie, ROP2 a été clonée dans un vecteur d'expression mycobactérien : pMV262, sous le contrôle du promoteur *hsp60*, du Bacille de Calmette et Guérin (BCG), le tout incorporé dans le BCG par électroporation. Les souris BALB/c auxquelles on a inoculé le recombinant BCG/pMV262-ROP2 ont développé une réponse immune spécifique contre les protéines de rhoptrie et un temps de survie nettement supérieur a été observé par rapport aux souris témoins lors d'une épreuve infectieuse (injection intra-péritonéale de 500 trophozoïtes de la souche RH de *Toxoplasma gondii*).

Ces résultats montrent que le BCG est un vecteur adéquat pour exprimer et présenter les antigènes de *Toxoplasma gondii.* Certaines considérations sont de plus en faveur de son utilisation : le BCG est une souche atténuée dérivée de *Mycobacterium bovis,* qui ne subit pas de réversion à la virulence. Il peut être administré dès la naissance et à n'importe quel âge. Sa production est à faible coût et c'est un vecteur relativement thermostable. Enfin, ce vecteur vivant bactérien joue aussi le rôle d'un adjuvant puissant, immunostimulant.

Cependant, une étude antérieure de vaccination sur des souris OF1 utilisant le BCG comme vecteur de l'antigène recombinant GRA1 n'avait pas été concluante (*Supply P. et al., 1999*). La nature de l'antigène vectorisé est donc un facteur primordial d'efficacité vaccinale. De plus, il semblerait que la réponse au BCG soit différente selon les lignées de souris.

▪**Souche atténuée de *Salmonella typhimurium*** (*Cong H. et al., 2005*)

Une souche atténuée de *Salmonella typhimurium (BRD509)* a été utilisée pour délivrer un plasmide eucaryote recombinant exprimant les gènes codant pour les antigènes SAG1 et SAG2 de *Toxoplasma gondii* ainsi qu'un gène codant pour la sous-unité A_2/B de la toxine du choléra (jouant le rôle d'adjuvant). Des souris de la lignée BALB/c ont été immunisées par voie intragastrique puis infectées 4 semaines après la dernière immunisation par voie intrapéritonéale par des tachyzoïtes de la souche RH du toxoplasme. Le temps de survie de ces souris par rapport aux groupes témoins a été fortement augmenté et 40% d'entre elles ont survécu.

3.3. Autres

▪**Les cellules dendritiques**

Elles jouent un rôle central dans la résistance au toxoplasme grâce à leur fonction de cellules présentatrices d'antigènes et leur capacité à induire une réponse cellulaire de type Th1. Des souris CBA/J chez lesquelles on a injecté des cellules dendritiques spléniques (SPDCs) stimulées par un extrait de toxoplasme présentent un nombre réduit de kystes cérébraux par rapport aux animaux

témoins. Les souris immunisées possèdent un fort titre en anticorps dirigés contre les antigènes majeurs du toxoplasme et on constate une forte sécrétion d'IFN γ et d'IL 2 témoins d'une réponse cellulaire de type Th1 (*Bourguin I. et al., 1998*).

▪Les exosomes

Ce sont de petites vésicules membranaires naturelles sécrétées par différents types de cellules immunitaires. Ils présentent à leur surface de nombreuses molécules du CMH I et II ainsi que des molécules de costimulation des LT. Leur efficacité a déjà été démontrée en cancérologie dans des essais cliniques les utilisant comme vecteurs d'antigènes tumoraux destinés à déclencher une réaction de rejet de la tumeur par l'organisme. L'utilisation d'exosomes dérivés de cellules dendritiques offre une alternative à la vaccination avec des cellules dendritiques seules, difficiles à obtenir en quantité adéquate pour un tel procédé. Les exosomes sécrétés par une lignée de cellules dendritiques (SRDC) chargées *in vitro* avec des antigènes de *Toxoplasma gondii* ont permis d'induire une immunité protectrice contre l'infection parasitaire à la fois chez les souris BALB/c et C57BL/6 (*Beauvillain C. et al., 2007*).

Les exosomes apparaissent comme de bons candidats à la prophylaxie vaccinale antiparasitaire en jouant à la fois un rôle de vecteur et d'adjuvant et par leur facilité d'obtention.

▪Les liposomes

Proches des exosomes, les liposomes sont des vésicules artificielles formées par des bicouches lipidiques concentriques, mimant les membranes biologiques. Ils sont de plus en plus développés dans la recherche pharmaceutique comme vecteurs de médicaments.

Plusieurs antigènes solubles spécifiques de stades de *Toxoplasma gondii* ont été inclus dans des liposomes et l'immunisation de souris adultes avec ces liposomes a montré un meilleur taux de survie de celles-ci après infection orale par des kystes tissulaires ainsi qu'une baisse de l'incidence des kystes cérébraux (*Elsaid M.M. et al., 1999)*. De même, l'utilisation de ces liposomes a permis une réduction significative de la transmission congénitale chez des souris de la lignée BALB/c ainsi qu'une baisse du taux de mortalité chez les jeunes souriceaux (*Elsaid M.M. et al., 2001*). Ils jouent également un rôle d'adjuvant.

4. Adjuvants utilisés

Le but de la vaccination est d'induire une forte réponse immune envers un ou plusieurs antigènes administrés. Atteindre cet objectif avec les vaccins inactivés requiert souvent l'ajout d'adjuvants, définis comme les substances qui améliorent l'immunogénicité de l'antigène vaccinal. Les adjuvants peuvent être classés selon leur nature, leurs propriétés physico-chimiques ou leur mécanisme d'action. Certains vecteurs, comme les liposomes, possèdent également un rôle adjuvant.
Les limites des adjuvants peuvent être leur toxicité (chez l'homme surtout), leur stabilité, leur biodisponibilité et leur coût de production. De plus, chaque adjuvant génère une réponse immune spécifique caractéristique, certains ne permettent donc pas d'obtenir le profil Th1 recherché (l'alun par exemple) (*Petrovsky N. et Aguilar J.C., 2004*).

Plusieurs d'entre eux, de natures variées, ont déjà été utilisés lors d'études vaccinales anti-toxoplasme :

4.1. Sels minéraux

Les sels d'alun (dérivés de l'aluminium) ont été utilisés comme adjuvants des vaccins humains depuis plus de 70 ans et malgré le fait qu'ils orientent plutôt la réponse cellulaire vers un type Th2, plusieurs études ont montré leur efficacité dans la protection contre *T.gondii (Martin V. et al., 2004)*. Il a été montré que l'alun augmente l'expression des molécules de CMHII et des molécules de costimulation (ICAM-1, LFA-3, CD40) associées aux cellules dendritiques matures (*Ulanova M. et al., 2001*).

4.2. Cytokines

L'utilisation des cytokines comme adjuvant est particulièrement intéressante dans la vaccination à ADN car les cytokines peuvent être exprimées par le même vecteur que l'antigène vaccinal.

▪**GM-CSF (**Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor).

C'est un facteur de croissance majeur des cellules dendritiques, qui permet l'augmentation du nombre de ces cellules chez la souris et l'homme (*Smooker P.M. et al., 2004*). C'est un adjuvant idéal pour les vaccins à ADN. Il permet de renforcer la réponse humorale et cellulaire par intensification du recrutement des macrophages et des cellules dendritiques au site d'injection (*Ismael A.B. et al., 2003*). Son efficacité à amplifier la réponse immune anti-toxoplasme a déjà été montrée dans plusieurs études sur souris (*Angus C.W. et al., 2000, Desolme B. et al., 2000*).

▪**Interleukines**

**L'interleukine 12*

Elle oriente rapidement et fortement la réponse immune vers un type Th1 et joue un rôle essentiel au cours de la phase aiguë de la toxoplasmose. Elle est sécrétée par les macrophages et les DC lors de la stimulation antigénique et permet l'activation des NK. Elle stimule la production d'IFN γ, essentiel à la résistance contre le parasite. Plusieurs études ont déjà montré son efficacité adjuvante dans des essais de vaccination anti-toxoplasmique (*Letscher-Bru V. et al., 1998 ; Zhang J. et al., 2007 ; Cui Y.L. et al., 2008*). Par contre, elle a parfois un effet délétère expliqué par la formation massive d'IFN γ induisant la production d'oxide nitrique ayant une action nécrotique sur la masse intestinale (*Desolme B. et al., 2000*).

**L'interleukine 2 (Chen G. et al., 2002)*

L'inoculation simultanée d'IL 2 murine et d'un plasmide codant pour la protéine SAG1 de *Toxoplasma gondii* (pcSAG1) a permis d'augmenter considérablement le temps de survie de souris soumises à une infection expérimentale par la souche RH par rapport aux souris simplement vaccinées avec pcSAG1.

▪**IFN γ**

On a déjà évoqué le rôle majeur de cette cytokine dans la protection contre l'infection toxoplasmique, notamment par l'induction d'une réponse cellulaire.L'immunisation de souris avec un plasmide codant pour la protéine ROP1 (pcROP1) combiné avec un plasmide codant pour l'IFN γ (pcIFN γ) a permis d'obtenir une réponse cellulaire de type Th1 d'intensité supérieure à celle induite par pcROP1 seul (*Guo H. et al., 2001*).

4.3. Dérivés bactériens

Les toxines bactériennes sont des adjuvants intéressants pour induire une immunité muqueuse à la fois humorale (sécrétion d'IgA) et cellulaire, mais leur toxicité est souvent un facteur limitant à leur utilisation chez l'homme.

▪**Entérotoxines thermolabiles d'*Escherichia Coli***

LTR72 et LTK63 sont les 2 mutants non toxiques d'entérotoxines thermolabiles qui ont été utilisés avec l'antigène SAG 1 dans un protocole de vaccination par voie intra-nasale (*Bonenfant C. et al., 2001*). Le nombre de kystes chez les souris immunisées était significativement moindre.

▪**Toxine du Choléra** (*Chardès T. et Bout D., 1993 ; Bourguin I. et al., 1993*)

La toxine du choléra est efficace pour induire une réponse intestinale locale à la fois humorale et cellulaire et peut donc être utilisée comme adjuvant lors de vaccination per os. C'est un bon inducteur de sécrétion d'IgA spécifiques et d'IFN γ. Son pouvoir adjuvant est lié à sa capacité à stimuler la synthèse d'AMPc, mais cette synthèse est par la suite stimulée continuellement et définitivement d'où la toxicité de la toxine cholérique, qui ne peut donc être utilisée chez l'homme.

4.4. Formulations d'adjuvants

On peut mélanger différents adjuvants, ayant des mécanismes d'actions différents, dans la même formulation.

▪**ISCOMS**

Ce sont des « complexes immunostimulants » *: Immuno Stimulating COMpound* composés de cholestérol + phosphatidyl-choline + glucoside de *Quillaja saponaria :* Quil-A (saponine, adjuvant tensioactif).

Ces systèmes sont efficaces par voie orale, ce qui est intéressant puisque c'est la voie préférentielle d'infection du toxoplasme. Ils induisent une réponse immune humorale et cellulaire de type I et ont permis d'obtenir une bonne protection vaccinale chez des souris immunisées avec des ISCOMS contenant des protéines de tachyzoïtes de la souche RH (*Lundén A. et al., 1993*).

Les inconvénients de ces formulations sont par contre leur faible stabilité et leur toxicité (*Petrovsky N. et Aguilar J.C., 2004*).

4.5. Autres

▪**CpG-ODN** (CpG-oligonucléotides)

Les motifs CpG sont des séquences immunostimulantes non codantes présentes au sein des brins d'ADN. Les oligonucléotides de synthèse portant des motifs CpG (CpG-ODN) sont parmi les adjuvants les plus puissants à l'heure actuelle, en partie grâce à leur capacité à stimuler à la fois les cellules du système immunitaire inné au moyen du Toll-like receptor 9 (TLR9) et les lymphocytes T et B spécifiques (immunité acquise). La production de cytokines induite oriente vers une réponse immune de type Th1.

Des porcs vaccinés avec des tachyzoïtes de la souche RH de *Toxoplasma gondii* associés à des CpG-ODN porcins ont bénéficié d'une protection significativement meilleure contre une infection par des ookystes de la souche VEG en comparaison avec des porcs vaccinés sans adjuvant (*Kringel et al., 2004*). L'utilisation des CpG-ODN comme adjuvants permet de plus de diminuer la quantité d'antigène vaccinal nécessaire (*Kringel H. et al., 2004*).

Chez des souris déjà infectées par *Toxoplasma gondii,* on a pu démontrer l'efficacité d'une vaccination thérapeutique avec un antigène de bradyzoïte (BAG 1) adjuvé par des CpG-ODN : ce traitement améliore le temps de survie des souris et diminue la charge parasitaire dans le cerveau (*Zimmermann S. et al., 2008*).

▪Salbutamol

Des souris vaccinées par voie intra-nasale avec la protéine SAG1 adjuvée par le salbutamol (agoniste β_2-adrénergique couramment utilisé contre l'asthme) ont montré une diminution significative des kystes cérébraux (estimée à 60%) par rapport aux souris recevant le vaccin protéique seul (*Fermin Z. et al., 1999*). Les propriétés adjuvantes du salbutamol semblent être liées à ses effets sur les cellules présentatrices d'antigène (notamment, les cellules dendritiques).

5. Voies d'immunisation

La voie d'administration de l'inoculum, tout comme la nature de l'adjuvant utilisé, a une importance majeure dans l'orientation de la réponse immune vaccinale. Elle va donc conditionner l'efficacité vaccinale et son importance dans le cas d'une prophylaxie vaccinale féline est aussi de nature pratique.

5.1. Voie parentérale

Cette voie d'immunisation est utilisée dans la plupart des modèles expérimentaux, pourtant, elle induit rarement une bonne immunité muqueuse. On rappelle à nouveau que ce point est capital car *in vivo*, le premier contact entre l'organisme et le parasite se fait au niveau de la muqueuse intestinale. De plus, elle s'avère peu pratique dans le contexte d'une campagne vaccinale à grande échelle chez le chat.

5.2. Voie orale

L'administration par voie orale est intéressante car elle stimule l'immunité locale intestinale, or le site naturel de l'infection par *Toxoplasma gondii* est la muqueuse intestinale.
Ce mode d'administration est le plus simple et le plus sécuritaire. Par contre, le milieu digestif étant un milieu peu favorable à l'antigène, la vaccination orale nécessite un inoculum important pour être efficace (*AFSSA, 2005*). Cette voie d'administration est compatible avec une vaccination en masse des chats : vaccin dissimulé dans la nourriture ou dans des appâts.

5.3. Voie intra nasale

Un de ses avantages est d'épargner au vaccin la dégradation par les enzymes protéolytiques gastro-intestinales, une moindre quantité d'antigènes est donc requise par rapport à l'immunisation par voie orale (*Garcia J.L., 2009*). Elle permet aussi, avec des doses antigéniques faibles, d'induire une réponse immunologique muqueuse importante (*Wu H.Y. et al., 1997*), en plus d'une réponse immune systémique.

5.4. Vaccination avec l'ADN nu par la technique biolistique : « gene gun » vaccination

La peau est bombardée avec des microparticules d'or enrobées d'ADN et tirées avec un pistolet à pression gazeuse (*gene gun*). Il semble que l'ADN soit ainsi capturé par les CPA (cellules dendritiques surtout) qui induisent une immunité humorale et cellulaire à long terme. L'avantage est que des gènes immunomodulateurs (cytokines ou molécules de costimulation) peuvent être incorporés dans la construction d'ADN en même temps que les gènes codant les antigènes, afin d'amplifier la réponse immunitaire souhaitée. Les séquences adjuvantes d'oligonucléotides bactériens (ADN CpG) peuvent également être insérées dans les plasmides producteurs de l'ADN.

Dans l'étude menée par Mohamed, une simple dose de 2 µg de plasmide contenant l'ADN recombinant de la protéine HSP70 injectée par la méthode biolistique à des souris a permis d'obtenir une protection plus efficace que l'injection d'une dose de 50 µg du même plasmide par voie intra-musculaire ou intra-péritonéale (*Mohamed R.M. et al., 2003*).

L'efficacité de cette technique de vaccination repose sur l'activation de LTc spécifiques et l'induction de la production d'IFN γ. Le derme est riche en CPA comme les cellules de Langerhans, les cellules dendritiques et les macrophages, contrairement au muscle, qui contient peu de CPA. La vaccination

par bombardement de la peau permet donc de transfecter directement les cellules dendritiques, qui se rendent ensuite aux nœuds lymphatiques drainant, ceci peut expliquer en partie l'efficacité de ce processus. Mais cette technique semble peu applicable dans le cadre d'une campagne vaccinale féline à grande échelle.

Au final, l'arsenal d'outils disponibles (antigènes, vecteurs, adjuvants) pour entreprendre l'élaboration d'un vaccin contre *Toxoplasma gondii* est plutôt riche. Ces outils sont de plus en plus connus et maîtrisés. La difficulté majeure réside dans la combinaison de ces différents facteurs et le choix de leur voie d'administration.

B. Les modèles d'étude et les essais de laboratoire

De plus en plus de vaccins antiparasitaires sont en passe d'être évalués dans des essais cliniques (vaccins contre la bilharziose, le paludisme, la leishmaniose). Ces essais font suite à des études précliniques menées *in vitro* puis sur des modèles animaux pour vérifier l'innocuité, évaluer l'immunogénicité et parfois, donner des indications sur l'efficacité des réponses immunes induites. Dans le cas de la toxoplasmose, la majorité des études vaccinales menées sont encore au stade préclinique.

1. Modèles animaux

La réceptivité et la sensibilité au toxoplasme sont très variables d'une espèce à une autre et même varient en fonction des lignées génétiques au sein d'une même espèce. Parmi les rongeurs de laboratoire, la souris et le hamster doré sont particulièrement réceptifs et sensibles : ils meurent rapidement (en 6 à 8 jours) après injection intrapéritonéale de tachyzoïtes du génotype I. Ces animaux sont utilisés pour le diagnostic biologique de la toxoplasmose, pour la préparation d'antigènes, ainsi qu'en tant que modèles dans les expériences d'élaboration de nouveaux vaccins, quelqu'en soit l'espèce cible finale.

1.1. La souris

Chez la **souris**, la réceptivité et la sensibilité à l'infection sont en partie déterminées génétiquement, les études utilisent donc des lignées différentes de souris. Par exemple :

-la lignée C57BL/6, très sensible à l'infection toxoplasmique,

-la lignée CBA/J, très résistante.

L'emplacement de certains gènes influençant le pouvoir pathogène du toxoplasme a été identifié dans l'espèce murine: il s'agit de gènes situés au sein des loci H2-L et H2-D du CMH. Certaines souris possédant les allèles *b* ou *k* d'un gène de la région D du complexe H2 développent de sévères encéphalites durant la phase chronique de l'infection toxoplasmique (souris des lignées CBA/J, C3H/HeJ et C57BL6). D'autres possédant l'allèle *d* ne présentent pas d'encéphalite (souris BALB/c et A/J) (*Garcia J.L, 2009*).

Letscher-Bru V a étudié l'effet de la vaccination avec la protéine SAG1 de *Toxoplasma gondii* sur l'incidence de la toxoplasmose congénitale chez des souris de différentes lignées (*Letscher-Bru V. et al., 2003*). Chez les souris BALB/c (H-2^d), la vaccination a réduit de 50% le nombre de fœtus infectés *in utero* et a entraîné une réponse immune à la fois de type 1 et 2. Chez les souris CBA/J (H-2^k), la vaccination a augmenté le nombre de fœtus infectés de 50% et a été associée à une réponse immune de type Th2 prédominante (*Letscher-Bru V. et al., 2003*). On voit donc l'influence du bagage génétique sur la réponse immunitaire observée.

Les observations faites sur la souris ne sont pas toujours transposables à d'autres animaux et à l'homme. Par exemple, la toxoplasmose congénitale est transmissible plusieurs fois *in utero* chez la souris (même par des femelles séropositives avant la gestation) tandis que ce n'est pas le cas chez les ovins ou les humains. Seules les souris de la lignée BALB/c sont intéressantes pour l'étude de la toxoplasmose congénitale, car chez ces souris, la transmission verticale n'est possible qu'une seule fois (*Garcia J.L, 2009*).

1.2. Le rat

Le rat a une grande résistance naturelle à l'infection : il peut supporter d'emblée des doses infectantes très élevées de parasites très virulents. Ceci permet l'entretien prolongé du toxoplasme *in vivo*. Cette différence de sensibilité avec la souris est la conséquence d'une multiplication très lente du toxoplasme dans les macrophages du rat (*Euzeby J., 1998*).
De plus, le rat semble être un modèle plus pertinent pour l'étude de la toxoplasmose congénitale humaine.

2. Evaluation de l'efficacité vaccinale

L'efficacité vaccinale peut être évaluée expérimentalement de diverses manières :
-par la réduction de la mortalité à la suite d'un challenge avec une souche létale,
-par la réduction de la charge parasitaire (estimée soit par le nombre de kystes dans le cerveau soit par PCR quantitative),
-par la réduction de la transmission materno-fœtale.
Ces techniques ne sont pas applicables chez l'homme.

Afin de pouvoir comparer l'immunogénicité d'un antigène fixé délivré avec différents vecteurs et associé à différents adjuvants, les protocoles des études vaccinales devraient être standardisés.
Jongert propose un ensemble de directives minimales pour la standardisation des protocoles d'étude : (*Jongert E. et al., 2009)*
1. Si les vaccins ont pour objectif d'enrayer la formation de kystes chez les modèles animaux, le nombre de kystes cérébraux doit être le critère principal d'étude (et non pas le taux de survie).
2. Lors d'infection expérimentale avec des kystes tissulaires, il est possible d'utiliser de l'émulsion cérébrale mais celle-ci doit être administrée par voie orale.
3. Les animaux immunisés doivent être soumis au minimum à deux épreuves d'infection par deux isolats de souches différentes de *Toxoplasma gondii.* La mise en évidence d'une protection contre le génotype II uniquement n'est pas suffisante pour démontrer l'existence d'une immunité protectrice contre les autres génotypes.
4. L'immunisation doit être faite sur plusieurs lignées différentes de souris de laboratoire, préférentiellement les souris BALB/c et C57BL/6 ou C3H/HeN.
5. L'efficacité vaccinale doit être également testée sur des souris hybrides, dont la génétique reflète plus celle des autres animaux et de l'homme.

Cependant, rien n'assure que les résultats obtenus sur rongeurs, si bons soient-ils, puissent être par la suite transposés au chat (qui nous intéresse ici) ou à l'homme.

3. Vaccins vivants atténués

Il s'agit des vaccins formulés à partir du parasite entier vivant. Parmi les approches classiques, ils constituent la stratégie vaccinale la plus couramment utilisée. Ils reposent sur l'utilisation d'un microorganisme apparenté apathogène ou peu pathogène pour l'espèce cible ou d'un microorganisme atténué par passages successifs en culture cellulaire ou sur une espèce différente de l'espèce cible, permettant alors l'apparition et la sélection de mutants avirulents ou très peu virulents (*Tizard I.R., 2008*). Ces agents infectieux atténués gardent la capacité de se multiplier chez l'hôte, et cette

multiplication est associée à une bonne réponse immunitaire humorale et cellulaire, proche de celle observée dans la nature contre le pathogène ciblé. Mais cette propriété de multiplication laisse craindre une possible réversion vers un phénotype virulent (*Van Oirschot J.T. et al., 1997*). Aujourd'hui, des méthodes plus rationnelles reposant sur une délétion ou une mutagenèse ciblée des gènes de virulence des pathogènes sont préférées. Le risque de réversion à la virulence est alors moindre (*Horzinek M.C. et al., 1997*) et après vaccination, l'absence d'anticorps contre le produit du ou des gènes délétés induit une différence de profil immunitaire entre animaux vaccinés et infectés très intéressante d'un point de vue diagnostic (*Van Kampen K.R., 2001*).

Tableau 5 : Avantages et inconvénients des vaccins vivants atténués.

(*Horzinek M.C. et al., 1997 ; Van Oirschot J.T. et al., 1997*)

Avantages	**Inconvénients**
-Ce type de vaccins induit une stimulation immunitaire similaire à celle engendrée lors d'une infection par le virus sauvage, et donc une immunité généralement plus rapide et plus durable que celle obtenue avec des vaccins à agents inactivés, -Une seule injection de primo-vaccination est nécessaire et la réplication de l'agent au sein de l'hôte permet une stimulation antigénique persistante de l'immunité à médiation humorale et cellulaire, ainsi que l'établissement d'une mémoire immunitaire, -Ces vaccins peuvent être administrés par voie muqueuse (voie d'infection naturelle), à l'origine d'une immunité locale, -Ils provoquent très peu d'effets secondaires et sont peu coûteux à la production.	Ces vaccins peuvent se répliquer chez l'hôte, d'où l'existence de certains risques tels que : -une virulence résiduelle liée à une technique de production inadaptée, -une réversion de virulence par mutation chez l'hôte, -la recombinaison avec d'autres virus, -la pathogénicité pour d'autres espèces, -la contamination par d'autres agents (bactéries, virus, mycoplasmes)

Ainsi, il est recommandé d'éviter l'utilisation de vaccins à agents vivants dans le cadre de la vaccination d'animaux immunodéprimés (risque de développement de l'infection), de jeunes âgés de moins de quatre semaines ou de femelles gestantes (activité tératogène potentielle) (*Pearson R.C. et al., 1986)*.

Enfin, des conditions particulières de conservation et de manipulation doivent être respectées (stockage au froid, usage modéré de produits désinfectants) (*Horzinek M.C. et al., 1997 ; Pearson R.C. et al., 1986)*.

Chez les petits ruminants et le chat, seuls les vaccins vivants atténués sont à ce jour (ou ont été) utilisés sur le terrain. Nous étudierons les particularités du vaccin félin en question (souche T 263) à l'occasion d'un chapitre ultérieur.

3.1. Chez les petits ruminants

▪La souche atténuée S 48

Le vaccin **OVILIS®, TOXOVAX** (commercialisé par la Société INTERVET sur le marché européen et Néo-zélandais) est utilisé uniquement chez les ovins, afin de prévenir une infection pendant la gestation et donc l'avortement. Il s'agit d'une suspension de tachyzoïtes de la **souche S 48** de *Toxoplasma gondii,* isolée à partir de membranes fœtales d'un avortement d'agneau en Nouvelle-Zélande et atténuée par passages successifs chez la souris. Cette souche a perdu sa capacité à former des kystes tissulaires (souche non kystogène et peu pathogène) car la différenciation des tachyzoïtes en bradyzoïtes ne se fait plus. Elle ne peut donc pas induire d'infection chronique (*Buxton D., 1993*). Les tachyzoïtes de la souche S48 induisent chez le mouton une infection de courte durée (environ 14 jours) avant d'être éliminés par le système immunitaire de l'hôte. Les brebis doivent être vaccinées par voie intramusculaire au moins 3 semaines avant la période de reproduction (on vaccine à partir de l'âge de 5 mois). Cette vaccination impose un temps d'attente lait et viande de 6 semaines. Le titre en Ac atteint un pic à 6 semaines et la réponse immune induite par le vaccin semble mettre en jeu à la fois les LTCD4+, LTCD8+ et l'IFN γ, qui assurent la destruction des tachyzoïtes (*Bhopale G.M., 2003*).

La vaccination prévient l'avortement chez les femelles infectées par une souche pathogène (protection de 70 à 80%, *Buxton D., 1993*), sans éviter l'infection du fœtus, et ne garantit pas pour autant l'absence de kystes dans la viande (une contamination naturelle antérieure à la vaccination pourrait avoir induit la formation de kystes) (*AFSSA, 2005* d'après *Buxton D. et Innes E.A., communication personnelle, 2005*).

L'immunité conférée est durable (jusqu'à 18 mois) et pourrait couvrir deux saisons d'agnelage ; en grande Bretagne, on conseille un rappel tous les deux ans (*Euzeby J., 1998*).

L'inconvénient majeur du vaccin constitué par la souche S 48 est sa difficulté de conservation car la préparation contient des tachyzoïtes. De plus, son administration requiert des précautions particulières puisqu'il s'agit d'un agent zoonotique.

▪Mutant Mic 1-3 KO (Knock-Out)

En 2004, une demande de brevet a conjointement été déposée par l'INRA, le CNRS et l'Université de Tours pour un nouveau vaccin anti-toxoplasme : « **TOXO KO** » qui utilise une souche mutée de *Toxoplasma gondii* (souche RH). Deux gènes jouant un rôle dans la virulence du protozoaire : Mic1 et Mic3 sont délétés par la technique du Knock-Out (ou recombinaison homologue). Cette mutation est stable et prévient tout risque de retour accidentel à la virulence.

Les protéines de micronèmes (MICs) se lient à des récepteurs de la cellule hôte. La désorganisation du gène Mic1 ou Mic3 provoque une légère baisse de virulence chez la souris, tandis que le mutant double KO (Mic 1-3 KO) a une virulence fortement atténuée.

Chez la souris (souche OF1), l'immunisation avec ce mutant double KO permet d'obtenir une forte réponse humorale et cellulaire de type Th1 avec une protection notoire contre la toxoplasmose chronique : plus de 96% de réduction des kystes cérébraux (*Ismael A.B. et al., 2006*). Il confère aussi une haute protection contre l'infection congénitale (survie de 100% des nouveau-nés).

Une étude réalisée chez 12 brebis séronégatives vaccinées par voie sous-cutanée (et soumises à une épreuve infectieuse par voie orale à mi-gestation) a permis de mettre en évidence une protection contre l'avortement dans 90% des cas (*Mévélec M.N. et al.*, 2008).

Les recherches sur l'effet protecteur de la souche atténuée « TOXO KO » sont actuellement poursuivies et les premiers vaccins pourraient être mis sur le marché dès 2012.

3.2. Chez la souris

▪Mutant privé de carbamoyl phosphate synthétase II

La carbamoyl phosphate synthétase II catalyse de nombreuses réactions du cytosol comme la synthèse des bases pyrimidiques (dont l'uracile). Les souches RH mutantes de *Toxoplasma gondii*, déficientes en cette enzyme, sont totalement avirulentes chez les souris immunocompétentes mais également chez les souris déficientes en IFN γ (*Fox B.A. et Bzik D.J., 2002*). Une unique injection de cette souche mutante chez des souris BALB/c induit une immunité protectrice à long terme contre une infection intra-péritonéale avec des tachyzoïtes de la souche RH (génotype I).

▪Tachyzoïtes CTK11 (*Radke J.R.et White M.W., 1999*)

Il s'agit de tachyzoïtes de la souche RH de *Toxoplasma gondii,* exprimant les séquences codantes de la fusion de l'acétyltransférase du chloramphénicol et de la thymidine kinase de l'Herpes Virus Simplex (**CAT-HSTK$^+$**). L'altération de la biosynthèse de la pyrimidine rend le parasite avirulent chez la souris

car il devient susceptible à une augmentation du niveau de thymidine dans la cellule hôte et sa croissance est ainsi stoppée. Par contre, il a été démontré que la viabilité des tachyzoïtes CTK11 (taux de croissance, invasion des cellules hôtes, viabilité extracellulaire) n'était pas affectée par rapport à la souche parentale RH. De plus, le degré d'atténuation du parasite peut être modulé par l'addition de thymidine exogène, notamment chez les souris KO pour l'IFN γ, d'ordinaire incapables de contrôler l'infection, même avec des souches avirulentes : ces souris peuvent survivre à une administration de CTK11, si elles reçoivent quotidiennement de la thymidine par injection sous-cutanée.

La vaccination des souris avec les tachyzoïtes CTK11 permet leur survie à une infection avec la souche RH. L'atténuation de la prolifération des tachyzoïtes par leur transfection avec l'$HSTK^+$ semble donc être une stratégie efficace.

4. Vaccins inactivés

L'agent infectieux contenu dans ce type de vaccin est par définition incapable de se multiplier chez l'hôte : il est inactivé par différentes méthodes physiques ou chimiques, ou certaines sous-unités de cet agent sont obtenues par purification ou génie génétique (protéines ou peptides immunogènes). Les vaccins inactivés présentent une bonne stabilité et innocuité mais l'immunogénicité des protéines peut être altérée par les différentes techniques de production.

Tableau 6 : Avantages et inconvénients des vaccins inactivés.

(*Horzinek M.C. et al., 1997 ; Pearson R.C. et al., 1986)*

Avantages	Inconvénients
Ce type de vaccin permet d'éviter tout risque de virulence résiduelle ou de réversion à la virulence, permettant une utilisation sûre chez les sujets à risque.	-Afin d'obtenir une réponse immune satisfaisante, ces vaccins doivent contenir une quantité importante de l'agent pathogène inactivé et nécessitent fréquemment la présence d'adjuvants, deux facteurs qui expliquent leur coût de production plus élevé, -La présence obligatoire d'adjuvants induit une toxicité à l'origine d'effets secondaires locaux et systémiques ainsi que de réactions d'hypersensibilité, - De plus, ces vaccins ne donnent souvent qu'une immunité courte, nécessitant des rappels assez rapprochés.

4.1. Vaccins protéiques

De nombreux essais vaccinaux ont déjà été menés avec des vaccins protéiques (voir *Annexe 5*), ci-dessous sont citées quelques-une de ces études vaccinales.

▪**Antigène membranaire : SAG1 (P 30)**

Des souris vaccinées par voie intranasale avec la protéine SAG1 adjuvée par des entérotoxines thermolabiles d'*Escherichia Coli :* LTR72 et LTK63 ont montré un nombre de kystes cérébraux significativement moindre (étude déjà évoquée lors de la présentation des adjuvants utilisés : *Bonenfant C. et al., 2001*).

▪**Antigène somatique : MAG1** (spécifique des kystes tissulaires)

L'immunisation des souris avec la protéine recombinante MAG 1 entraîne une réduction significative des kystes cérébraux après infection et permet la survie de 60% des souris immunisées après une exposition infectante à 500 kystes d'une souche de génotype II (*Parmley S. et al., 2002*).

Le mécanisme immunitaire responsable de l'augmentation du taux de survie des souris immunisées avec rMAG1 n'est pas connu mais on suppose qu'elle est due à une meilleure élimination locale des bradyzoïtes dans l'intestin pendant la phase initiale de l'infection orale. Si moins de parasites échappent à l'immunité muqueuse pour établir l'infection, la charge parasitaire en phase aiguë sera réduite, donnant une meilleure chance au système immunitaire d'éliminer les parasites disséminés.

Ceci met en avant l'intérêt d'un vaccin contenant à la fois des composants antigéniques de bradyzoïte et de tachyzoïte car les parasites échappant à l'immunité intestinale spécifique des bradyzoïtes seraient alors ciblés par l'immunité spécifique des tachyzoïtes dans les autres tissus.

▪**Antigène métabolique : ROP1 (**antigène de rhoptrie)

La vaccination de souris avec la protéine ROP1 adjuvée par le salbutamol par voie intranasale a déjà été évoquée lors de l'étude des adjuvants (*Fermin Z. et Bout D., 1999*).

4.2. Vaccins à ADN

▪Vaccins monoantigéniques

******Antigène membranaire :* ***SAG1 (P 30)***

L'immunisation de souris (par voie intramusculaire) avec un plasmide exprimant le gène codant pour SAG1 a permis d'obtenir des réponses immunes humorale et cellulaire protectrices. Les souris immunisées ont survécu à une infection par des kystes tissulaires d'une souche de génotype II, contrairement aux souris témoins. Elles présentent également moins de kystes cérébraux que les souris témoins. Par contre, aucune protection n'a été observée lors d'infection par des tachyzoïtes de la souche virulente RH (génotype I) (*Angus C.W. et al., 2000*).

Plusieurs autres études avaient déjà rapporté l'efficacité partielle de la vaccination avec l'antigène SAG1 chez des souris (*Bülow R. et Boothroyd J.C., 1991 ; Aosai F. et al., 1999 ; Nielsen H.V. et al., 1999*).

******Antigène cytoplasmique :* ***GRA1***

L'immunisation de souris par un vecteur plasmidique contenant la séquence d'ADN de la protéine GRA1 a permis de mettre en évidence une protection de 75 à 100% des souris vaccinées (*Scorza T. et al., 2003*).

L'immunisation de moutons avec un *Mycobacterium bovis* recombinant (BCG) sécrétant la protéine GRA1 a permis d'obtenir une réponse cellulaire spécifique caractérisée par une prolifération lymphocytaire sanguine et par la production d'IFN γ, par contre, aucune production d'anticorps anti-GRA1 n'a été détectée (*Supply P. et al., 1999*).

******Antigène métabolique : antigène de rhoptrie,* ***ROP2***

La réponse immune induite par l'injection d'un plasmide à ADN codant pour la protéine ROP2 a été étudiée chez trois souches de souris : BALB/c, C57BL/6 et CBA/J (*Leyva R. et al., 2001*). La réponse immune observée est mixte (Th1/Th2) et n'est pour l'instant pas protectrice contre l'infection par la souche virulente RH.

▪Vaccins à ADN multiantigéniques

La combinaison d'antigènes stimulants à la fois la réponse humorale et cellulaire, et représentant plusieurs stades parasitaires pourrait permettre d'améliorer la vaccination à ADN anti-toxoplasme. La question soulevée par ces vaccins multiantigéniques est la relative contribution de chaque antigène dans la protection ainsi obtenue. Voici quelques exemples d'essais vaccinaux multiantigéniques menés contre *Toxoplasma gondii.*

*****Antigènes métaboliques : antigènes de micronèmes* (*Beghetto E. et al., 2005*)

Divers antigènes de micronèmes, portant des épitopes B (susceptibles d'être reconnus par des Ac), ont été utilisés dans l'étude menée par Beghetto (2005): MIC2, MIC4, M2AP (MIC2 Associated-Protein) et AMA1(Apical Membrane Antigen 1). MIC2, MIC3, MIC4 et M2AP contiennent également des épitopes T (*Beghetto E. et al., 2005*).

La vaccination avec l'ADN de ces antigènes (cloné dans un vecteur plasmidique de mammifère : pcDNA3) a permis la réduction de 84% du nombre de kystes cérébraux chez des souris infectées expérimentalement par des kystes parasitaires d'une souche avirulente de génotype II de *Toxoplasma gondii* (*Beghetto E. et al., 2005*).

*****Antigène membranaire et antigène métabolique* : ***SAG1*** + ***ROP2*** (*Zhang J. et al., 2007*)

Les souris immunisées avec un plasmide codant pour les 2 antigènes présentent un taux de survie important après infection avec la souche RH. La réponse immune induite est plus forte que lors d'immunisation avec un plasmide n'exprimant qu'un seul gène. De plus, la co-administration d'un plasmide encodant l'IL-12 murine comme adjuvant a permis une protection bien meilleure.
Une étude ultérieure utilisant le plasmide pSAG1-ROP2-SAG2 adjuvé par pIL12 a permis d'obtenir une meilleure protection que l'étude précédente (*Cui Y.L. et al., 2008*). Ce vaccin trigénique montre une efficacité supérieure à celle des vaccins bigéniques ou monogéniques testés.

*****Antigène membranaire et antigène cytoplasmique* : **SAG1** + **GRA4** (*Mévélec M.N. et al., 2005*)

Un meilleur taux de survie (75%) est obtenu lors de l'immunisation de souris avec les 2 plasmides simultanément. Précédemment, l'immunisation avec l'un ou l'autre des plasmides seul avait permis d'atteindre un taux de survie de 62%. La protection est encore renforcée lors de co-inoculation avec le plasmide codant pour le GM-CSF (87% de survie). De plus, ce vaccin multiantigénique adjuvé par le

GM-CSF s'est avéré apporter une protection significative contre la toxoplasmose chronique et une protection partielle contre la toxoplasmose congénitale.

Antigènes cytoplasmiques et antigène métabolique* : **GRA1 + **GRA7**+ **ROP2** (*Jongert E. et al., 2007*)

La vaccination des souris avec ce « cocktail » d'antigènes a permis d'obtenir une réponse humorale et cellulaire satisfaisante et une protection complète contre la toxoplasmose aiguë lors d'infection par la voie naturelle. La quantité de kystes cérébraux a été réduite de 81% chez les souris vaccinées. Des taux similairement élevés ont été obtenus avec une vaccination bigénique composée des antigènes GRA1 et GRA7 (89% de réduction des kystes cérébraux), GRA7 et ROP2 (79% de réduction) mais pas avec GRA1 et ROP2.

Lors de vaccination monogénique, seule la vaccination avec le gène GRA7 a permis d'obtenir une bonne protection et une forte production d'IFN γ. GRA7 est une protéine plus immunogène et ceci est corrélé à l'induction de cette forte production d'IFN γ en réponse à l'antigène.

Ainsi, GRA7 semble être un élément indispensable des formules multiantigéniques pour la vaccination contre *Toxoplasma gondii.*

Ces formulations multiantigéniques se révèlent la plupart du temps plus efficaces, mais certains aspects complexes de la réponse immune induite restent parfois inexpliqués et le juste choix des antigènes s'avère primordial.

Il est possible d'augmenter l'efficacité des vaccins à ADN par divers moyens chez des animaux autres que les modèles de laboratoire (utilisation d'adjuvants moléculaires co-exprimés dans les plasmides, électroporation…) (*Smooker P.M. et al., 2004*). Cependant, des améliorations doivent encore être faites avant d'atteindre une efficacité maximale qui permettrait de réelles applications en médecine vétérinaire ou humaine.

▪Cas de l'ELI (Expression Library Immunization)

C'est un système d'expression multivalent qui utilise l'ADN génomique entier du parasite ou l'ADN spécifique de stade afin de générer un vaccin. Utilisée pour la vaccination contre *Toxoplasma gondii* (*Fachado A. et al, 2003*), l'ELI a induit une réponse immune protectrice au long terme de type Th1 et a permis d'obtenir un taux de survie significatif chez des souris BALB/c infectées par la souche RH, 6 mois après l'immunisation par un plasmide eucaryote.

C. La vaccination féline

1. Vaccin déjà élaboré : un vaccin vivant atténué

Pour vacciner le chat, on a d'abord essayé d'utiliser un antigène hétérologue, fourni par un toxoplasmatiné voisin du toxoplasme, *Hammondia hammondi*, agent d'une coccidiose du chien, mais les résultats furent décevants (*Euzeby J., 1998*).

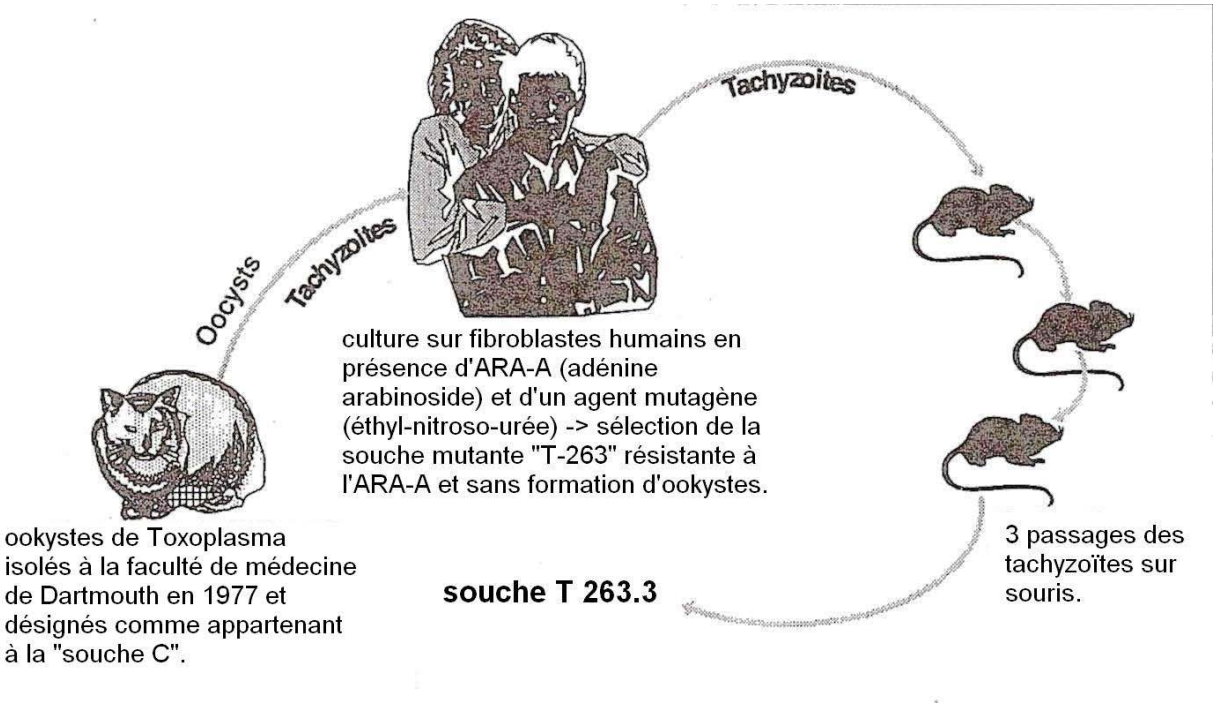
1.1. La souche T 263 : caractéristiques et obtention.

Le seul vaccin félin qui a été testé sur le terrain aux Etats-Unis est issu d'une souche mutante atténuée du toxoplasme : la souche **T 263**.

Cette souche induit une immunité qui permet de supprimer l'élimination d'ookystes chez le chat. L'infection coccidienne se limite à la schizogonie, sans gamétogonie ni formation d'ookystes : la partie sexuée du cycle coccidien n'a pas lieu car un seul gamonte (mâle ou femelle) est produit. Ceci permet de diminuer la pression parasitaire dans l'environnement mais ne protège en revanche pas l'animal de l'infection. L'administration du vaccin se fait par voie orale (administration de bradyzoïtes vivants de la souche mutante).

La souche T 263 a été élaborée par incubation de tachyzoïtes de la souche C (de génotype III) de *Toxoplasma gondii* avec du N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine (agent mutagène). Ensuite, les tachyzoïtes sont cultivés sur fibroblastes humains ou murins dans un milieu contenant de l'adénine arabinoside (Ara-A). Les mutants résistants à l'Ara-A subissent à nouveau des mutations au contact de l'éthyl-nitroso-urée. La souche mutante T 263 de *Toxoplasma gondii* a été sélectionnée parmi plusieurs clones obtenus (117 clones en tout) parce qu'elle induit une immunité protectrice chez le chat et prévient la formation d'ookystes après infection par une souche sauvage (*Frenkel J.K. et al., 1991*).

Figure11: Origine de la souche T-263.3 ARA-A résistante de Toxoplasma gondii (Choromanski L.et al., 1995 d'après Frenkel J.K. et al., 1991).



La vaccination, opérée par voie orale, nécessite deux administrations à intervalle de 3 ou 4 semaines d'un vaccin renfermant 1000 bradyzoïtes. Le vaccin doit être maintenu congelé jusqu'à son utilisation car les parasites ne survivent que quelques heures à température ambiante.

Frenkel *et al.* (1991) ont montré que l'administration de **bradyzoïtes** de la souche T-263 permettait d'empêcher l'excrétion d'ookystes chez 84% des chatons vaccinés (31 chatons sur 37) et soumis à une infection expérimentale par voie orale, utilisant des bradyzoïtes de la souche sauvage T 265 de *Toxoplasma gondii*.

Freyre a obtenu 100% d'inhibition de l'excrétion d'ookystes chez des chatons immunisés avec des **bradyzoïtes** de la souche T-263 (*Freyre A. et al., 1993*). Par contre, la même protection contre l'excrétion d'ookystes n'est pas obtenue avec l'administration de **tachyzoïtes** de la souche T-263, même lorsque cette administration est faite directement par voie duodénale (afin d'éviter la digestion pepsique), et ce malgré le développement de forts taux d'anticorps (*Freyre A. et al., 1993*). Cette absence d'immunisation complète chez les chats vaccinés avec un inoculat de tachyzoïtes reste inexpliquée.

1.2. Etude des risques vaccinaux.

Une étude sur 203 chatons et chats sains (de 2 à 24 mois), séronégatifs pour *Toxoplasma gondii*, a été entreprise afin de démontrer la stabilité de la souche T 263 et son incapacité à produire une toxoplasmose clinique et à entraîner l'excrétion d'ookystes (*Choromanski L .et al., 1995*). L'administration du vaccin (bradyzoïtes vivants de la souche T263) se fait par voie orale. Les résultats montrent que le vaccin est 100% sécuritaire: aucun des 203 chats vaccinés n'a excrété d'ookystes ni n'a montré de signes de toxoplasmose clinique après la vaccination.

Il a été également montré lors de cette étude que la souche vaccinale était incapable de subir une réversion à la virulence ou à la formation d'ookystes et ne pouvait survivre à des passages successifs sur différents hôtes définitifs (chats). De plus, cette souche est inexistante dans l'environnement car elle ne peut se reproduire chez l'HD, le cycle est donc incomplet.

Lorsque les sujets vaccinés sont infectés par la leucose féline (donc potentiellement immunodéprimés), l'administration de la souche T 263 ne conduit pas à une ré-excrétion d'ookystes en début d'infection (6 à 7 mois post infection). Par contre, s'il s'agit de chats infectés sur le long terme par le FeLV (plus de 11 mois), il existe des risques vaccinaux : mort possible de l'animal suite à la leucose compliquée d'une toxoplasmose clinique. On en a conclu que le vaccin avec la souche T 263 pouvait exacerber une leucose féline avancée. Il a donc été recommandé d'utiliser ce vaccin vivant atténué sur des chats sains exclusivement.

1.3. Résumé des caractéristiques du vaccin oral utilisant la souche T 263 (*Choromanski L.et al., 1995*)

C'est un vaccin dont l'utilisation est relativement sûre :

-ce vaccin semble anodin pour les chatons/chats sains (absence de toxoplasmose clinique et d'excrétion d'ookystes),

-la souche vaccinale ne subit pas de réversion à la virulence ou à l'excrétion d'ookystes lors de passages successifs sur chatons sensibles. De plus, elle s'avère être incapable de survivre à ces passages successifs sur hôte définitif, contrairement à la souche sauvage T-265,

-il reste phénotypiquement stable également lorsqu'il est soumis à des passages multiples sur souris (afin de forcer une réversion de la virulence),

-il reste phénotypiquement stable lorsqu'il est administré à des chats immunodéprimés (chats positifs pour le FeLV ou femelles gestantes),

-le vaccin est obtenu à partir d'une souche pure et dépourvu de souches mutantes annexes accidentelles,

-il se dissipe rapidement dans la sphère buccale des chatons tout juste vaccinés, ce qui rend le risque de transmission à l'homme négligeable (pour cette étude, les chercheurs ont tenté d'isoler des bradyzoïtes de la souche T 263 de la cavité buccale des chats juste après vaccination orale),
-enfin, le mutant T 263 est incapable de survivre dans l'environnement.

La souche vaccinale peut être distinguée de la souche sauvage car elle porte un marqueur génétique de résistance à l'adénine arabinoside (Ara-A^R), ce qui lui permet de croître dans des milieux contenant cet anti-métabolite. Ceci peut être utile dans le cadre d'un dépistage sérologique.

Il existe tout de même certaines contre-indications vaccinales : il n'est pas recommandé d'utiliser ce vaccin sur les femelles gestantes, sur les chats atteints du FeLV à un stade avancé ainsi que sur les chats sous traitement immunosuppresseur.

La durée de l'immunité conférée n'est pas connue avec certitude, et à priori ne se prolonge pas toute la vie du chat.

2. Etudes de terrain

Seul le vaccin félin issu de la souche T 263 a fait l'objet d'études de terrain afin d'observer les éventuels bénéfices d'une vaccination du chat sur l'incidence de la toxoplasmose. Pourtant, les modalités d'utilisation de ce vaccin étaient plutôt inappropriées à une campagne de vaccination sur une population importante de chats.
Par ailleurs, des modélisations mathématiques ont été récemment élaborées afin d'évaluer de manière prévisionnelle les retombées des diverses mesures de prévention qu'il est possible de mettre en place, dont la vaccination.

2.1. Un exemple d'étude de terrain : évaluation de l'impact d'une vaccination féline sur la prévalence de l'infection par Toxoplasma gondii chez les porcs

(*Mateus-Pinilla N.E. et al., 1999*)

▪Objectifs et principes de l'étude

Cette étude a été menée aux Etats-Unis (Illinois) dans plusieurs fermes porcines afin de déterminer l'impact d'un vaccin félin sur la prévalence de l'infection par *Toxoplasma gondii* chez les porcs.
En effet, aux Etats-Unis, le porc est considéré comme la première viande source d'infections toxoplasmiques humaines. L'origine principale de la contamination des porcs semble être l'ingestion

de nourriture et d'eau souillées par des ookystes rejetés dans les fèces de chats. La transmission du toxoplasme repose donc en majorité sur l'excrétion féline d'ookystes. La stratégie la plus efficace pour réduire le risque d'infection des porcs est donc de contrôler l'infection et le rejet d'ookystes par les chats des fermes et ce par la vaccination. L'hypothèse testée dans cette étude est que la vaccination des chats de fermes permettrait une diminution de la prévalence de *T. gondii* chez les truies, les porcs à l'engrais, les souris et chez les chats non vaccinés auparavant.

Pour cette étude, le vaccin vivant atténué contenant des bradyzoïtes de la souche T 263 de *T. gondii* a été utilisé. C'est aussi l'occasion de tester la faisabilité et l'efficacité de ce vaccin sur le terrain.

Dans le cadre de l'étude, le vaccin fut administré oralement à tous les chats de plus de deux mois capturés dans chaque ferme participant (8 fermes en tout) pendant 2 années consécutives. Puis chacune de ces fermes a fait l'objet de 3 visites durant l'année d'investigation ayant suivi la campagne de vaccination (au printemps, au début et à la fin de l'été). Des échantillons sanguins des porcs, ainsi que des souris et des chats capturés ont été recueillis. De plus, des fragments de tissus encéphaliques et cardiaques de rongeurs ainsi que des fèces de chats ont été collectés. Le test d'agglutination modifié (MAT) a été utilisé pour déterminer les titres en anticorps anti-toxoplasme dans le sérum des animaux prélevés. Cette méthode ne permettant pas de différencier les anticorps vaccinaux des anticorps naturels présents suite à une infection, seuls les chats capturés pour la première fois, donc non vaccinés, ont été inclus dans l'étude de séroprévalence.

▪Résultats et facteurs limitants

L'année d'investigation, aucune excrétion d'ookystes n'a été détectée chez les chats capturés. Sur l'ensemble des fermes de l'étude, une baisse significative de la séroprévalence des porcs à l'engraissement a été observée, ce qui se répercute directement sur le risque de transmission zoonotique. Par contre, cette baisse n'était pas significative chez les souris (la séroprévalence initiale étant déjà très faible) et chez les truies. Chez les truies, on impute ceci à une exposition antérieure plus élevée et à un temps de séjour sur la ferme plus long par rapport aux porcs à l'engrais, dont la population est renouvelée tous les 6 mois et sur lesquels la répercussion des changements d'exposition au parasite sera donc plus visible et rapide.

Une corrélation évidente est apparue entre les changements de séroprévalence pour *T. gondii* chez les jeunes chats et ceux observés chez les porcs à l'engraissement (voir *Annexe 8*).

Les suivis sérologiques des chats de l'étude durant les deux années de campagne vaccinale ont permis de montrer qu'il était possible de capturer et de vacciner une large proportion de jeunes chats (73%) avant leur première exposition à une souche sauvage de *T. gondii*.

Il est évident que l'induction d'une immunité vaccinale sur le terrain est moins efficace qu'en laboratoire. Pour les jeunes chats de l'étude, le pourcentage de séroconversion était de 48% après la

première vaccination et de 85% après la seconde vaccination (cas des chats ayant été capturés 2 fois pendant la campagne vaccinale). Dans des conditions de laboratoire, l'étude de Frenkel avait montré 84% de séroconversion après la première vaccination (*Frenkel J.K. et al., 1991*) et celle de Freyre, 100% de séroconversion après la seconde vaccination (*Freyre A. et al., 1993*).
L'explication la plus probable de cet échec de séroconversion chez plusieurs chats de l'étude serait une immunodéficience de certains chats sauvages du fait de maladies intercurrentes et d'un état général médiocre de ces animaux comparés à des chats de laboratoire; ceci constitue un frein à l'efficacité de la stratégie vaccinale mise en place. Toutefois, la vaccination a eu un impact détectable sur la prévalence de *T. gondii* dans l'écosystème des fermes étudiées. On a donc appuyé l'hypothèse selon laquelle le vaccin félin anti-toxoplasme permettrait de réduire la prévalence du parasite dans les réservoirs infectieux des porcs fermiers.

Cependant, certains facteurs limitant la mise en œuvre d'une campagne vaccinale sur le terrain ont pu être mis en avant :
-les chats doivent être capturés en nombre suffisant afin de vacciner une majorité de la population de chats séronégatifs (c'est-à-dire non encore exposés à une souche sauvage du parasite, donc très jeunes). L'importance numérique des chats errants pose donc problème,
-la capture des chats aux alentours des fermes, souvent peu accoutumés à la manipulation humaine, s'avère difficile et une anesthésie est fréquemment nécessaire à l'administration du vaccin. Le fait que l'on vise plutôt une population de jeunes chats, plus manipulables est donc, dans ce cas, un avantage,
-le vaccin doit être conservé dans l'azote liquide et délivré dans les 15 minutes après décongélation pour une efficacité maximale (*Choromanski L. et al., 1995*). Ceci rend les manipulations quasiment irréalisables en pratique.

Le bilan de cette étude, menée à l'échelle d'une ferme (qui était l'unité d'analyse statistique ici), pourrait être extrapolé à celle d'une région ou même d'un pays, et confirme alors l'utilité de la vaccination féline dans la lutte contre l'infection toxoplasmique des espèces de rente, et donc indirectement, de l'homme. Cependant, il apparaît aussi que la mise en place d'une telle prophylaxie est difficile, tant dans son organisation que dans sa réalisation, et ce d'autant plus que le champ d'action voulu est étendu (un pays tout entier par exemple…).

2.2. Simulation informatique de l'impact de la prévention vaccinale féline dans les fermes porcines.

(*Mateus-Pinilla N.E. et al., 2002*)

Appliqué à l'étude de Mateus-Pinilla N.E. (1999) précitée, un modèle de simulation dynamique assisté par ordinateur a permis d'investiguer la transmission de *Toxoplasma gondii* dans les populations de chats et de porcs au sein de l'écosystème constitué par l'unité de production porcine (la ferme). Plusieurs paramètres censés hypothétiquement diminuer l'infection des porcs à l'engrais ont été modulés dans diverses simulations :

-la vaccination des chats (deux programmes de vaccination différents ont été testés : la vaccination de terrain pratiquée lors de l'étude précédente et une vaccination au sevrage),

-l'augmentation de la proportion de chats capturés pour la vaccination : 0, 50 ou 75% des chats,

-la diminution du nombre initial de chats : 50, 40, 30, 20 ou 10 chats,

-la baisse du taux de prévalence initial des chats pour *Toxoplasma gondii* : 90, 60 ou 30%,

-la diminution du temps de survie des ookystes : 52, 39 ou 26 semaines.

L'étude réalisée en 1999 (*Mateus-Pinilla N.E. et al., 1999*) ne permettait pas de distinguer les effets de la vaccination des fluctuations naturelles associées à la survie des ookystes, au nombre de chats présents et à leur prévalence initiale car il n'y avait pas de fermes témoins (non vaccinées). Le modèle de simulation proposé permet de pallier ce manque.

Les résultats ont montrés que la diminution de la prévalence chez les porcs à l'engrais était d'abord corrélée à la diminution du nombre de chats sur la ferme, puis à la diminution du temps de survie des ookystes et enfin à la vaccination des chats (notamment par le programme de vaccination au sevrage). Par contre, il s'est avéré qu'aucune corrélation n'existait entre la prévalence initiale des chats et la prévalence des porcs à l'engrais.

La simulation a donc confirmé l'efficacité vaccinale (avec une efficacité supérieure du programme de vaccination au sevrage) mais montre que l'impact d'une campagne de vaccination sur la prévalence chez les porcs est inférieur à celui d'une diminution du nombre de chats présents à proximité des fermes. De plus, si la vaccination permet une diminution de la prévalence de *Toxoplasma gondii* chez le porc, l'infection n'est pas pour autant éradiquée : après 10 ans de vaccination, quel que soit le programme vaccinal utilisé, *Toxoplasma gondii* est encore présent chez les porcs à l'engrais dans 67% des simulations effectuées. Dans aucune étude le parasite n'est éliminé totalement de la population féline, ceci du fait du maintien du parasite dans l'environnement et du haut taux de reproduction des chats, fournissant en permanence de nouveaux hôtes non immuns et donc sensibles. Ceci explique l'impact majeur d'une diminution de la population initiale de chats. Ainsi, contrôler la population de chats apparaît être une stratégie plus efficace que la vaccination. Cependant, le nombre de chats sauvages présents dans un habitat correspond au nombre que la niche écologique peut supporter. Le

retrait des chats d'une zone d'exploitation ne ferait que créer une niche vide pour d'autres individus (chats migrants, nouveaux-nés), qui seraient non immuns et donc plus sensibles. Le problème ne serait donc que temporairement résolu voire exacerbé à plus long terme. La solution serait donc la stérilisation, menée en parallèle avec une campagne de vaccination. Les deux stratégies combinées devraient permettre de minimiser au mieux la transmission du parasite.

Tableau 7: Association de chaque facteur expérimental avec le pourcentage de simulations dans lesquelles l'infection par Toxoplasma gondii a été éliminée chez les porcs à l'engrais

(Mateus-Pinilla N.E. et al., 2002).

Experimental factor	Level	Number of simulations	Percent with *T. gondii* elimination in finishing-pigs
Vaccination	Vaccination	180	33
	No vaccination	45	27
Vaccination schedule	Weaning	90	39
	Field	90	27
Proportion of cats captured (%)	0	45	27
	50	90	32
	75	90	33
Oocyst survival (weeks)	26	75	47
	39	75	28
	52	75	20
Initial *T. gondii* prevalence in cats (%)	30	75	31
	60	75	32
	90	75	32
Initial number of cats	10	45	100
	20	45	47
	30	45	11
	40	45	0
	50	45	0

La vaccination des chats tout juste sevrés est intéressante, car plus efficace d'après le modèle informatique. Cependant, cette stratégie devrait nécessiter sur le terrain de cibler les moments où la population de chats récemment sevrés est maximale. Etant donné que la reproduction chez le chat a lieu sur une large période, il faudrait pour potentialiser au maximum cette stratégie vaccinale, administrer le vaccin continuellement dans la nourriture ou dans des appâts. Mais ce mode d'administration est impossible avec le vaccin T-263, qui doit rester congelé jusqu'à son administration pour maintenir les bradyzoïtes en vie (*Choromanski L. et al., 1995*).

Etonnamment, la prévalence initiale chez les chats n'est pas corrélée avec celle observée chez les porcs, c'est en réalité le nombre de chats excréteurs qui importe, et non pas le nombre de chats séropositifs. Ceci conforte la faible utilité du dépistage sérologique chez le chat. Les individus les plus à risque sont les jeunes chats non immuns qui, s'ils s'infectent deviendront excréteurs.

Concernant la durée de survie des ookystes, il semble difficile de jouer sur les conditions environnementales pour la diminuer. Ce paramètre ne donnera donc pas lieu à des mesures préventives.

3. Essais vaccinaux chez le chat.

3.1. Vaccination par voie intra nasale avec des protéines de rhoptrie

(*Garcia et al., 2007*)

Une étude a été faite sur des chats vaccinés par voie intra-nasale avec des protéines de rhoptrie brutes du toxoplasme adjuvées par de la saponine Quil-A afin d'évaluer les répercussions sur l'excrétion d'ookystes (*Garcia J.L. et al., 2007*).

Après immunisation intra-nasale de chats séronégatifs avec 3 doses antigéniques (à 0, 21 et 42 jours), les animaux sont soumis à une infection expérimentale avec 600 kystes de la souche VEG au 51ème jour. Tous les chats immunisés ont subi une séroconversion (IgG et IgA détectées) et la protection a été évaluée à 67%.

Chez 2 des 3 chats vaccinés avec des protéines de rhoptrie par la voie intra nasale, aucun ookyste de *Toxoplasma gondii* n'a été trouvé lors d'observation au microscope dans les fèces (entre le 2ème et le 15ème jour après l'infection expérimentale).

Dans cette étude, l'échantillon de chats est très restreint : 3 chats vaccinés avec les protéines de rhoptrie et Quil-A, 3 chats ayant reçu du PBS (phosphate buffered saline) avec Quil-A, 3 chats n'ayant reçu que du PBS mais subissant quand même l'infection expérimentale et enfin 2 chats ayant reçu du PBS seul et non infectés. Il est donc difficile de conclure à une protection vaccinale contre l'excrétion ookystale, d'autant plus que nous avons déjà évoqué la difficulté à mettre en évidence les ookystes de *Toxoplasma gondii* dans les fèces.

3.2. Vaccination avec des souches de Toxoplasma gondii irradiées au Cobalt 60 (^{60} Co-irradiation)

(*Omata Y. et al., 1996*)

Les parasites irradiés conservent leur capacité à entrer dans les cellules mais sont incapables de se multiplier une fois dans la cellule hôte.

Chez la souris, la vaccination avec des tachyzoïtes irradiés au Cobalt 60 (souches RH ou Beverley de *Toxoplasma gondii*) induit une immunité protectrice efficace même lors d'infection expérimentale avec la souche RH, très virulente.

L'expérience a été renouvelée sur des chats et l'efficacité d'une telle vaccination sur la prévention de l'excrétion d'ookystes a été évaluée : seule la vaccination avec la souche non virulente de *Toxoplasma gondii* (^{60} Co-Beverley) permet de prévenir l'excrétion d'ookystes chez seulement 3 chats sur 7.

3.3. Vaccination avec rROP2 vectorisé par l'herpesvirus félin de type 1 (FHV1)

(*Mishima M. et al., 2002*)

Le FHV, pathogène spécifique des félidés, est rendu déficient en Thymidine kinase (TK) : FHVdlTK, ce qui permet de le rendre apathogène chez le chat. L'unité d'expression contenant le fragment d'ADN qui encode le précurseur de ROP2 est insérée dans la région codante TK du virus FHV. L'avantage par rapport aux vaccins *Toxoplasma* sous-unitaires, aux vaccins à ADN ou aux vaccins vivants est que le FHVdlTK se propage par contagiosité entre les chats, ce qui est très intéressant dans le cadre d'une immunisation collective sur le terrain mais les risques de mutation et donc de réversibilité à la virulence sont alors fortement augmentés.

La vaccination des chats avec FHV/ROP2 induit la présence d'IgG reconnaissant l'Ag natif, dans le sérum des chats. De plus, ces anticorps inhibent *in vitro* l'invasion des tachyzoïtes.

In vivo, la vaccination accélère la réponse en IgG après une infection par le toxoplasme et réduit le taux de parasites localisés dans le cerveau chez le chat.

En revanche, la vaccination n'a pas permis une diminution du nombre d'ookystes rejetés par les chats, l'objectif principal n'est donc pas atteint.

4. Bilan des études vaccinales menées sur le chat

Tableau 8: Tableau récapitulatif des études d'immunisation contre Toxoplasma gondii menées chez le chat.

vaccin candidat (antigène(s) + vecteur)	**adjuvant**	**animaux utilisés**	**voie d'administration**	**infection induite**	**résultats obtenus**	**Etude**
bradyzoïtes vivants de la souche **T263**			voie orale	ookystes de la souche **T265**, voie orale	84% d'inhibition de l'excrétion d'ookystes	*Frenkel J.K. et al., 1991*
bradyzoïtes vivants de la souche **T263**		chats SPF(specific pathogen free) entre 9 et 11 semaines, mâles et femelles	voie orale	ookystes de la souche **T265**, voie orale	100 % de séroconversion et d'inhibition de l'excrétion d'ookystes	*Freyre A. et al., 1993*
tachyzoïtes de la souche **T263**			voie orale ou intraduodénale	souche **T265**, voie orale	séroconversion chez 100% des chats mais inhibition incomplète de l'excrétion d'ookystes	*Freyre A. et al., 1993*
tachyzoïtes irradiés au Cobalt 60, des souches **RH** ou **Beverley**		chats séronégatifs pour *Toxoplasma gondii* de 3 mois, mâles et femelles	voie intramusculaire	kystes tissulaires de la souche **Beverley** (II) par voie orale	Inhibition partielle de l'excrétion d'ookystes par immunisation avec la souche **Beverley** (seulement 3 chats protégés sur 7), absence d'inhibition par immunisation avec la souche **RH**	*Omata Y. et al., 1996*
antigène ROP2 (souche **RH**) vectorisé par rFHVdlTK (feline herpesvirus type 1)		8 siamois SPF de 4 mois	voie intranasale	kystes tissulaires de la souche **Beverley** (II) par voie orale	absence de kystes cérébraux chez 100% des chats immunisés, pas d'influence sur l'excrétion d'ookystes	*Mishima M. et al., 2002*
protéines de rhoptrie de tachyzoïtes de la souche **LIV-5**	Quil-A	3 Short-hair séronégatifs pour *Toxoplasma gondii*, entre 5 et 8 mois, mâles et femelles	voie intranasale	kystes tissulaires de la souche **VEG** (III) par voie orale	67% d'inhibition de l'excrétion d'ookystes	*Garcia J.L. et al., 2007*

Remarque : Ne figure pas dans ce tableau l'étude de Choromanski (1995), pourtant menée sur des chats, car celle-ci complète l'étude antérieure menée par Frenkel (1991) en s'intéressant à certaines caractéristiques vaccinales (sécurité du vaccin pour le chat vacciné et pour l'homme administrateur, cas des chats co-infectés par le FeLV, possibilités de transmission à l'homme…).

Pour l'instant, la meilleure protection vaccinale obtenue reste celle avec le vaccin vivant atténué de la souche T 263. Il faut noter qu'avec la même souche vaccinale, Freyre (1993) a obtenu de meilleurs résultats que Frenkel (1991). Ceci peut être attribué à deux facteurs : d'une part, les chats ont reçu deux doses vaccinales dans l'étude de Freyre, contre une seule lors de l'étude de Frenkel ; d'autre part, l'intervalle entre l'immunisation et l'infection expérimentale avec la souche sauvage était plus court (28 à 40 jours) dans l'étude de Frenkel, que dans l'étude de Freyre (47 jours après la deuxième immunisation).

L'interprétation et la comparaison de ces différentes études s'avèrent très difficiles car celles-ci ne sont pas standardisées. Les facteurs de variation d'une étude à l'autre sont trop nombreux : souche vaccinale, type de vaccin (vivant atténué, protéique, à ADN), dose d'inoculat, présence ou absence d'adjuvant, voie d'administration, état physiologique des chats immunisés…
La réponse immunitaire est stimulée dans la majorité des cas (séroconversion obtenue chez la quasi-totalité des animaux immunisés), mais la protection contre l'excrétion d'ookystes conférée par cette réponse est inconstante. Or le but d'une vaccination féline, on le rappelle, est d'enrayer totalement cette excrétion. Il reste donc des progrès à faire dans les formulations vaccinales, cette problématique multifactorielle étant très complexe.

▪Le vaccin félin idéal

Un vaccin idéal doit induire une réponse en anticorps et lymphocytes T cytotoxiques de niveau élevé et de longue durée contre les antigènes parasitaires ainsi qu'une mémoire immunitaire. Il doit aussi être sûr, pratique à manipuler et avoir un coût raisonnable.

En synthétisant toutes les informations apportées précédemment, on peut énumérer les éléments qui caractériseraient une formulation vaccinale contre *Toxoplasma gondii* idéale pour le chat :
-le vaccin doit *a minima* empêcher l'excrétion d'ookystes par le chat (donc enrayer le cycle intestinal du parasite) ou mieux, empêcher également l'infection du chat par *Toxoplasma gondii,*
-le vaccin doit stimuler l'immunité locale intestinale car la voie orale est la voie d'infection naturelle du parasite. Par exemple, une vaccination *per os* permet d'induire une réponse immunitaire muqueuse. De plus, cette voie d'administration permet d'envisager une vaccination des populations de chats sauvages à l'aide d'appâts alimentaires,
-pour ces raisons, le vaccin doit être stable à température ambiante et les conditions de sa conservation les moins contraignantes possibles,
-la production du vaccin doit être facile en grande quantité et à faible coût,
-l'immunité induite doit être de longue durée afin d'espacer au maximum les rappels vaccinaux (point important dans le cadre d'une campagne de vaccination en masse incluant les populations sauvages),

-le vaccin doit être sûr (pas de réversion à la virulence possible), à la fois pour l'animal et pour le manipulateur humain. De plus, on doit pouvoir l'administrer à de jeunes chats, tout juste sevrés, avant que ceux-ci ne se contaminent dans leur environnement,
-des antigènes de tous les stades parasitaires doivent être présents dans la formulation vaccinale et la souche parasitaire choisie doit permettre une protection croisée, ceci afin d'induire une immunité complète contre le toxoplasme,
-la réponse immune cellulaire induite par la vaccination doit être majoritairement de type Th1,
-si possible, les anticorps vaccinaux doivent pouvoir être distingués des antigènes naturels (cette exigence ne vaut que si on envisage des études de séroprévalence féline).

Les vaccins à ADN multiantigéniques répondent à la plupart de ces exigences, à condition d'être correctement vectorisés et adjuvés. Mais une administration par voie orale n'est pas encore envisageable pour ce type de vaccins, ce qui en fait de mauvais candidats à une campagne vaccinale féline de grande échelle, visant majoritairement les individus errants et sauvages.

L'unique vaccin félin utilisé sur le terrain (souche T 263) ne présente certes pas toutes les qualités requises pour une campagne vaccinale de grande importance. Pour autant, la seule étude ayant évalué l'impact d'une prophylaxie vaccinale féline contre la toxoplasmose (*Mateus-Pinilla N.E. et al., 1999*) a permis d'encenser une telle mesure en montrant sa répercussion positive sur la séroprévalence des animaux destinés à la consommation, source majeure de contamination humaine.

De multiples outils vaccinaux sont à l'heure actuelle utilisés et avec la plupart des antigènes à l'étude, un certain degré d'immunité protectrice a été obtenu, évalué par une augmentation du taux de survie et une réduction du nombre de kystes cérébraux chez les animaux immunisés (voir *Annexe 9 et 10*). Il est donc légitime d'aspirer à la mise au point future d'un vaccin félin efficace et compatible avec les contraintes imposées par une vaccination à grande échelle.

Pour l'instant, seule l'administration de tachyzoïtes vivants de la souche atténuée ts-4 de *Toxoplasma gondii* (*Gazzinelli R.T. et al., 1991*) a permis d'établir une protection complète et de longue durée contre l'infection par la souche RH, sans signes de toxoplasmose aiguë ou chronique (formation de kystes) chez des souris de lignées variées. La variété des antigènes présentés au système immunitaire de l'hôte pourrait expliquer les meilleurs résultats obtenus avec des vaccins vivants atténués par rapport aux vaccins à ADN. Il est probable que l'activation de la réponse immune contre la souche RH et l'amélioration de la protection obtenue contre les souches kystogènes puissent être obtenues avec une combinaison d'antigènes qui cibleraient simultanément le processus d'attachement et d'invasion cellulaire et les protéines métaboliques du parasite. Ceci confirme l'intérêt déjà évoqué d'une vaccination multiantigénique.

De même, les espoirs d'une vaccination anti-toxoplasme humaine résident dans les vaccins à ADN multiantigéniques codants pour des épitopes très immunogènes et adjuvés de manière efficace.
Une étude réalisée sur des femmes enceintes déjà infectées auparavant a montré que les antigènes GRA1, GRA7 et SAG1 pouvaient induire une réponse cellulaire avec production de cytokines de type Th1 chez une majorité de patientes en phase chronique de toxoplasmose (*Fatoohi A.F. et al., 2002*). Ces antigènes sont donc des candidats pour l'élaboration d'un vaccin permettant de prévenir une toxoplasmose congénitale mais aucun d'entre eux n'a été reconnu par tous les sujets simultanément. La variation considérable dans les réponses cellulaires individuelles aux antigènes toxoplasmiques doit être considérée pour le développement d'un vaccin anti-toxoplasme humain (*Fatoohi A.F. et al., 2002*).

CONCLUSION

L'aspect zoonotique mondial de la toxoplasmose en fait une parasitose de première importance ciblée par les organisations de santé publique comme la WHO, qui recommande continuellement la collecte de données épidémiologiques sur l'infection parasitaire. De telles données sont primordiales pour déterminer l'importance relative des différentes sources d'infection humaine, pour contrôler la maladie et ses conséquences. Cependant, très peu de pays dans le monde exercent une surveillance épidémiologique de l'infection humaine, et encore moins de la toxoplasmose animale.

L'importance relative des différentes voies de transmission horizontale du toxoplasme à l'homme reste encore très discutée. Certaines études ont identifié la consommation de viande peu cuite comme le principal facteur de risque, cependant il a été montré qu'au sein d'une population de végétariens stricts, plus de 47% d'entre eux étaient séropositifs (*Tenter A.M. et al., 2000*). En réalité, la source principale d'infection par *Toxoplasma gondii* est différente d'une population à une autre en fonction des cultures et des habitudes alimentaires. De nombreux facteurs ont un impact sur l'épidémiologie du parasite : le type de gestion et le mode de production du bétail, les normes d'hygiènes à l'abattoir, la densité de chats ou de félins sauvages dans l'environnement, les conditions environnementales ayant un impact sur la sporulation des ookystes (température, humidité, vent), la localisation géographique, les habitudes de consommation humaine, etc. La place du chat dans la transmission de cette parasitose est donc variable suivant les régions du monde mais de manière constante, le chat reste la source initiale de contamination de l'environnement et indirectement des hôtes intermédiaires et de l'homme. Il semble difficile de mettre en place des stratégies de contrôle qui soient valables partout dans le monde et dans toutes les ethnies. La résolution du problème à sa source : empêcher l'excrétion ookystale par la vaccination de l'hôte définitif (félin), pourrait être une solution à validité mondiale, mais une forte hétérogénéité persisterait sans doute dans son application.

Le développement des vaccins antiparasitaires a jusqu'alors peu intéressé l'industrie pharmaceutique, car leur marché est peu solvable, les maladies cibles touchant des populations le plus souvent démunies (exemple de la leishmaniose pour laquelle 90% des cas humains à répercussion viscérale sont concentrés dans 5 pays : Bengladesh, Brésil, Inde, Népal et Soudan, ou du paludisme qui agit en Afrique intertropicale). Mais les ouvertures semblent différentes dans le cas de la toxoplasmose, beaucoup plus cosmopolite, et sévissant également dans des pays développés. Dans ces pays développés, on a assisté ces dernières décennies à une baisse de la prévalence de la maladie, sans doute en partie du fait de l'émergence des technologies de production modernes (les animaux sont

gardés à l'intérieur, la nourriture et l'eau sont stérilisées, l'accès est rendu impossible aux autres animaux comme les rongeurs, les oiseaux et les chats). Par contre, le récent engouement pour l'élevage en « plein air », le bien être animal, les produits « bio » risque d'être à l'origine d'une réémergence de l'infection. La nécessité de trouver une solution fiable et efficace pour combattre cette parasitose est donc tout à fait d'actualité.

La difficulté d'une vaccination animale à grande échelle ne se confine pas à son élaboration mais également à sa mise en place et son application : le choix de la population ciblée est important (chats sauvages, chats domestiques, âge des animaux lors de la vaccination…). Au terme de notre réflexion, notre choix se portera sur l'ensemble des chatons juste après sevrage, et à minima sur les populations de chats à proximité des zones d'élevage. Concrètement, la vaccination des chats de ferme contre la toxoplasmose et le contrôle de leur population pourrait être incluse dans les programmes d'Assurance Qualité de ces exploitations. Mais imposer une vaccination non thérapeutique aux propriétaires de chats domestiques s'avère une mesure plus difficile à faire accepter, le vaccin félin ayant pour principal objectif d'enrayer l'excrétion d'ookystes, sans pour autant empêcher l'infection de l'animal. On pourrait donc qualifier cette mesure de « **vaccination altruiste** » (*Frenkel J.K. et al ; 1991*), le but étant le contrôle d'une zoonose ubiquitaire, et non la préservation de la santé du chat.

BIBLIOGRAPHIE

-ABBASI M., KOWALEWSKA-GROCHOWSKA K., BAHAR M.A., KILANI R.T., WINKLER-LOWEN B., GUILBERT L.J. Infection of placental trophoblasts by *Toxoplasma gondii*. *J Infect Dis.* 2003, **188** (4), 608-616.

-AFSSA (DEROUIN F., BULTEL C., ROZE S.), Toxoplasmose : état des connaissances et évaluation du risque lié à l'alimentation, Rapport du groupe de travail « *Toxoplasma gondii* » de l'AFSSA, décembre 2005, 316p.

-AJZENBERG D., BAÑULS A.L., SU C., DUMETRE A., DEMAR M., CARME B., DARDE M.L. Genetic diversity, clonality and sexuality in *Toxoplasma gondii*. *Int. J. Parasitol.,* 2004, **34** (10), 1185-1196.

-ANGUS C.W., KLIVINGTON-EVANS D., DUBEY J.P., KOVACS J.A. Immunization with a DNA plasmid encoding the SAG1 (P30) protein of *Toxoplasma gondii* is immunogenic and protective in rodents. *J. Infect. Dis.* 2000, **181** (1), 317-324.

-AOSAI F., MUN H.S., NOROSE K., CHEN M., HATA H., KOBAYASHI M. *et al.* Protective immunity induced by vaccination with SAG1 gene-transfected cells against *Toxoplasma gondii* infection in mice. *Microbiol. Immunol.*. 1999, **43** (1), 87-91

-BAHIA-OLIVEIRA L.M., DARDE L.M., AMENDOEIRA M.R., *Toxoplasma gondii* centennial anniversary: 100 years of research to celebrate all over the world. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz,* 2009, **104** (2): 129-131.

-BAHIA-OLIVEIRA L.M., JONES J.L., AZEVEDO-SILVA J., ALVES C.C., OREFICE F., ADDISS D.G., Highly endemic, waterborne toxoplasmosis in north Rio de Janeiro state, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.*, 2003, **9** (1), 55-62.

-BARBOSA H.S., FERREIRA-SILVA M.F., GUIMARAES E.V., CARVALHO L., RODRIGUES R.M. Absence of vacuolar membrane involving *Toxoplasma gondii* during its intranuclear localization. *J. Parasitol.* 2005, **91** (1), 182-184.

-BEAUVAIS B., GARIN J.F., LARIVIERE M., LANGUILLAT G., GALAL H., Toxoplasmose et transfusion. *Ann Parasitol Hum Comp.* 1976, **51**, 625-635.

-BEAUVILLAIN C., RUIZ S., GUITON R., BOUT D., DIMIER-POISSON I., A vaccine based on exosomes secreted by a dendritic cell line confers protection against T. gondii infection in syngeneic and allogeneic mice, *Microbes Infect.*, 2007, **9** (14-15), 1614-1622.

-BEGHETTO E., NIELSEN H.V., DEL PORTO P., BUFFOLANO W., GUGLIETTA S., FELICI F. *et al*., A combination of antigenic regions of *Toxoplasma gondii* microneme proteins induces protective immunity against oral infection with parasites cysts. *J. Infect. Dis.*, 2005, **191** (4), 637-645.

-BERGER F., La toxoplasmose en France chez la femme enceinte : séroprévalence et estimation de l'incidence à partir d'enquêtes nationales. Mémoire de Master M2 « Epidémiologie et recherche clinique ». Université Paris XI. 2005.

-BETTIOL S.S., OBENDORF D.L., NOWARKOWSKI M., MILSTEIN T., GOLDSMID J.M., Earthworms as paratenic hosts of toxoplasmosis in eastern barred bandicoots in Tasmania. *J. Wildl Dis.* 2000, **36** (1), 145-148.

-BHOPALE G.M., Development of a vaccine for toxoplasmosis: current status.*Microbes Infect.* , 2003, **5** (5), 457-462.

-BLEWET D.A., WATSON W.A., The epidemiology of ovine toxoplasmosis. II. Possible sources of infection in outbreaks of clinical disease. *Brit Vet J.* 1983, **139**, 546-555.

-BONENFANT C., DIMIER-POISSON I., VELGE-ROUSSEL F., BUZONI-GATEL D., DEL GIUDICE G., RAPPUOLI R., BOUT D. Intranasal immunization with SAG1 and nontoxic mutant heat-labile enterotoxins protects mice against Toxoplasma gondii. *Infect. Immun.* 2001, **69** (3), 1605-1612.

-BOOTHROYD J.C. *Toxoplasma gondii*: 25 years and 25 major advances for the field. *Int J Parasitol.* 2009.

-BOURDEAU P., La toxoplasmose des carnivores. *Rec. Méd. Vét.,* 1993, **169** (5-6), 457-472.

-BOURGUIN I., CHARDES T., BOUT D. Oral immunization with *Toxoplasma gondii* antigens in association with cholera toxin induces enhanced protective and cell-mediated immunity in C57BL/6 mice. *Infect. Immun.* 1993, **61** (5), 2082-2088.

-BOURGUIN I., MOSER M., BUZONI-GATEL D., TIELEMANS F., BOUT D., URBAIN J., LEO O., Murine dendritic cells pulsed in vitro with *Toxoplasma gondii* antigens induce protective immunity in vivo. *Infect. Immun.*, 1998, **66** (10), 4867-4874.

-BOUT D., BUZONI-GATEL D., DEBARD I DIMIER N., BOURGUIN I., MEVELEC M.N., VELGE-ROUSSEL F. *et al.*, Vaccination par voie muqueuse contre la toxoplasmose. CJF-INSERM « Immunologie des maladies Infectieuses », 1996, 3p.

-BOWIE W.R., KING A.S., WERKER D.H., ISAAC-RENTON J.L., BELL A., ENG S.B., MARION S.A., Outbreak of toxoplasmosis associated with municipal drinking water. *Lancet*, 1997, **350**, 173-177.

-BROCHIER B., KIENY M. P., COSTY F., COPPENS P., BAUDUIN B., LECOCQ J. P. *et al.* Large-scale eradication of rabies using recombinant vaccinia-rabies vaccine. *Nature*, 1991, **354**, 520-522.

-BÜLOW R., BOOTHROYD J.C.. Protection of mice from fatal *Toxoplasma gondii* infection by immunization with p30 antigen in liposomes. *J. Immunol.* 1991, **147** (10), 3496-3500.

-BUSSIERAS J., CHERMETTE R., Parasitologie vétérinaire. Protozoologie. Polycopié Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Service de parasitologie. 1992, 185p.

-BUTCHER B.A., KIM L., JOHNSON P.F., DENKERS E.Y. *Toxoplasma gondii* tachyzoites inhibit proinflammatory cytokine induction in infected macrophages by preventing nuclear translocation of the transcription factor NF-kappa B. *J. Immunol.* 2001, **167** (4), 2193-2201.

-BUXTON D. Toxoplasmosis: the first commercial vaccine. *Parasitol Today*. 1993, **9** (9): 335-337.

-CAETANO B.C., BRUÑA-ROMERO O., FUX B., MENDES E.A., PENIDO M.L., GAZZINELLI R.T., Vaccination with replication-deficient recombinant adenoviruses encoding the main surface antigens of toxoplasma gondii induces immune response and protection against infection in mice. *Hum. Gene Ther.* 2006, **17** (4), 415-426.

-CESBRON-DELAUW M.F., CAPRON A., Excreted/secreted antigens of *Toxoplasma gondii* – their origin and role in the host-parasite interaction. *Res. Immunol.*, 1993, **144** (1): 41-44.

-CHARDES T., BOUT D., Mucosal immune response in toxoplasmosis. *Res. Immunol.*, 1993, **144** (1): 57-60.

-CHEN G., CHEN H., GUO H., ZHENG H., Protective effect of DNA-mediated immunization with a combination of SAG1 and IL-2 gene adjuvant against infection of *Toxoplasma gondii* in mice. *Chin. Med. J. (Engl)*, 2002, **115** (10), 1448-1452.

-CHOROMANSKI L., FREYRE A., POPIEL R., BROWN K., GRIEVE R., SHIBLEY G., Safety and efficacy of modified live feline *Toxoplasma gondii* vaccine. *Dev. Biol. Stand.*, 1995, **84**: 269-281

-CONG H., GU Q.M., JIANG Y., HE S.Y., ZHOU H.Y., YANG T.T., LI Y., ZHAO Q.L.. Oral immunization with a live recombinant attenuated *Salmonella typhimurium* protects mice against *Toxoplasma gondii*. *Parasite Immunol.* 2005, **27** (1-2), 29-35.

-CONRAD P.A., MILLER M.A., KREUDER C., JAMES E.R., MAZET J., DABRITZ H., JESSUP D.A., GULLAND F., GRIGG M.E., Transmission of *Toxoplasma*: clues from the study of sea otters as sentinels of *Toxoplasma gondii* flow into the marine environment. *Int. J. Parasitol.*, 2005, **35** (11-12), 1155-1168.

-COOK A.J., GILBERT R.E., BUFFOLANO W., ZUFFEREY J., PETERSEN E., JENUM P.A., FOULON W., SEMPRINI A.E., DUNN D.T. Sources of toxoplasma infection in pregnant women: European multicentre case-control study. European Research Network on Congenital Toxoplasmosis. *British Medical Journal.* 2000, **321** (7254), 142-147.

-COSTA J.M., DARDE M.L., ASSOULINE B., VIDAUD M., BRETAGNE S., Microsatellite in the beta-tubulin gene of *Toxoplasma gondii* as a new genetic marker for use in direct screening of amniotic fluids. *J. Clin. Microbiol.,* 1997, **35** (10), 2542-2545.

-CUI Y.L., HE S.Y., XUE M.F., ZHANG J., WANG H.X., YAO Y. Protective effect of a multiantigenic DNA vaccine against *Toxoplasma gondii* with co-delivery of IL-12 in mice. *Parasite Immunol.* 2008, **30** (5), 309-313.

-DARDE M.L. Genetic analysis of the diversity in *Toxoplasma gondii*. *Ann Ist Super Sanita*. 2004, **40** (1), 57-63.

-DARDE M.L., PEYRON F., Toxoplasmose. *In* F. Denis. « Bactéries, champignons et parasites transmissibles de la mère à l'enfant » Ed. John Libbey Eurotext. 2002, 317-347.
-DAVIS S.W., DUBEY J.P., Mediation of immunity to *Toxoplasma gondii* oocyst shedding in cats. *J Parasitol.* 1995, **81** (6), 882-886.

-DAVIDSON M.G., Toxoplasmosis.*Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2000, **30** (5), 1051-1062.

-DAVIDSON M.G., ROTTMAN J.B., ENGLISH R.V., LAPPIN M.R., TOMPKINS M.B., Feline immunodeficiency virus predisposes cats to acute generalized toxoplasmosis. *Am. J. Pathol*. 1993; **143** (5): 1486-1497.

-DENKERS E.Y., GAZZINELLI R.T., Regulation and function of T-cell-mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection. *Clin. Microbiol. Rev.*, 1998, **11** (4), 569-588.

-DESOLME B., MEVELEC M.N., BUZONI-GATEL D., BOUT D. Induction of protective immunity against toxoplasmosis in mice by DNA immunization with a plasmid encoding *Toxoplasma gondii* GRA4 gene. *Vaccine.* 2000, **18** (23), 2512-2521.

-DI CRISTINA M., DEL PORTO P., BUFFOLANO W., BEGHETTO E., SPADONI A., GUGLIETTA S. *et al*., The *Toxoplasma gondii* bradyzoite antigens BAG1 and MAG1 induce early humoral and cell-mediated immune responses upon human infection. *Microbes Infect.* 2004, **6** (2), 164-171.

-DIMIER I.H., BOUT D.T., Interferon-gamma-activated primary enterocytes inhibit *Toxoplasma gondii* replication: a role for intracellular iron. *Immunology*, 1998, **94** (4), 488-495.

-DLUGONSKA H., Toxoplasma rhoptries: unique secretory organelles and source of promising vaccine proteins for immunoprevention of Toxoplasmosis. *J. Biomed. Biotechnol.*, 2008; 2008: 632424.

-DUBEY J.P, A review of toxoplasmosis in wild birds. *Vet. Parasitol.,* 2002a, **106** (2), 121-153.

-DUBEY J.P, Tachyzoite-induced life cycle of *Toxoplasma gondii* in cats. *J Parasitol.* 2002b, **88** (4), 713-717.

-DUBEY J.P, Oocyst shedding by cats fed isolated bradyzoites and comparison of infectivity of bradyzoites of the VEG strain *Toxoplasma gondii* to cats and mice. *J Parasitol.* 2001, **87** (1), 215-219.

-DUBEY J.P, *Toxoplasma gondii* oocysts survival under defined temperatures. *J. Parasitol.*, 1998, **84**, 862-865.

-DUBEY J.P, Infectivity and pathogenicity of *Toxoplasma gondii* oocysts for cats. *J. Parasitol.*, 1996, **82**, 957-961.

-DUBEY J.P, Duration of immunity to shedding of *Toxoplasma gondii* oocysts by cats. *J Parasitol*. 1995, **81** (3), 410-415.

-DUBEY J.P, Toxoplasmosis. *J.Am.Vet.Med.Assoc*., 1994, **205** (11) : 1593-1598.

-DUBEY J.P, Long-term persistence of *Toxoplasma gondii* in tissues of pigs inoculated with *T. gondii* oocysts and effect of freezing on viability of tissue cysts in pork. *Am. J. Vet. Res.*, 1988a, **49** (6), 910-913.

-DUBEY J.P, Lesions in transplacentally induced toxoplasmosis in goats. *Am. J. Vet. Res.* 1988b, **49** (6), 905-909.

-DUBEY J.P, Toxoplasmosis in cats. *Feline Practice*. 1986, **16** (4), 12-26.

-DUBEY J.P, Toxoplasmosis in dogs. *Canine Practice*. 1985, **81**, 887-893.

-DUBEY J.P., BEATTIE C.P., Toxoplasmosis of animals and man. Boca Raton, FL: CRC Press, 1988, 220p.

-DUBEY J.P., CARPENTER J.L. Histologically confirmed clinical toxoplasmosis in cats: 100 cases (1952-1990). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1993, **203** (11), 1556-1566.

-DUBEY J.P., FRENKEL J.K., Cyst-induced toxoplasmosis in cats. *J Protozool.* 1972, **19** (1), 155-177.

-DUBEY J.P., GAMBLE H.R., HILL D., SREEKUMAR C., ROMAND S., THUILLIEZ P., High prevalence of viable *Toxoplasma gondii* infection in market weight pigs from a farm in Massachusetts. *J Parasitol.* 2002, **88** (6), 1234-1238.

-DUBEY J.P, KOTULA A.W., SHARAR A., ANDREWS C.D., LINDSAY D.S., Effect of high temperature on infectivity of *Toxoplasma gondii* tissue cysts in pork. *J. Parasitol.* 1990, **76** (2), 201-204.

-DUBEY J.P., LAPPIN M.R., Toxoplasmosis and neosporosis. In: Greene, C.E., ed. Infectious diseases of the dog and cat. 3rd ed. Philadelphia: Saunders, 2006, 754-775.

-DUBEY J.P., LAPPIN M.R., THULLIEZ P. Diagnosis of induced toxoplasmosis in neonatal cats. *J. Am. Vet. Med. Assoc*. 1995; **207** (2): 179-185

-DUBEY J.P., MILLER N.L., FRENKEL J.K., The *Toxoplasma gondii* oocyst from cat feces. J. Exp. Med. 1970, **132**, 636-662.

-DUBEY J.P., MURRELL K.D., HANBURY R.D., ANDERSON W.R., DOBY P.B., MILLER H.O., Epidemiologic findings on a swine farm with enzootic toxoplasmosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1986, **189** (1), 55-56.

-DUBEY J.P., ODENING K., Toxoplasmosis and related infections. *In*: Parasitic Diseases of Wild mammals. SAMUEL W.M., PYBUS M.J., KOVAN A.A. Eds Manson Publishing. Second Edition, London, 2001, 478-519.

-DUBEY J.P., ZARNKE R., THOMAS N.J., WONG S.K., VAN BONN W., BRIGGS M. et al., *Toxoplasma gondii, Neospora caninum, Sarcocystis neurona* and *Sarcocystis canis*-like infections in marine mammals. *Vet. Parasitol.*, 2003, **116** (4), 275-296.

-DUNCANSON P., TERRY R.S., SMITH J.E., HIDE G., High levels of congenital transmission of *Toxoplasma gondii* in a commercial sheep flock. *Int J Parasitol.* 2001, **31** (14), 1699-1703.

-DUPOUY-CAMET J., GAVINET M.F., PAUGAM A., TOURTE-SCHAEFER C., Mode de contamination, incidence et prévalence de la toxoplasmose. *Méd. Mal. Inf.*, 1993, **23** (spécial): 13-147.

-ELSAID M.M., MARTINS M.S., FRÉZARD F., BRAGA E.M., VITOR R.W., Vertical toxoplasmosis in a murine model. Protection after immunization with antigens of Toxoplasma gondii incorporated into liposomes. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2001, **96** (1), 99-104.

-ELSAID M.M., VITOR R.W., FREZARD F.J., MARTINS M.S., Protection against toxoplasmosis in mice immunized with different antigens of Toxoplasma gondii incorporated into liposomes. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1999, **94** (4), 485-490.

-EUZEBY J., Grand dictionnaire illustré de parasitologie médicale et vétérinaire. Lavoisier, 2008, 818p.

-EUZEBY J. Toxoplasmose. *In :* Les parasites des viandes. Epidémiologie, physiopathologie, incidences zoonosiques. *Editions Lavoisier, Paris,* 1998, 45-90.

-EUZEBY J. L'infection toxoplasmique du chat : incidences économiques et sociales. *Prat. Méd. Chir. Anim. Comp.*, 1993, **28**, 195-209

-FACHADO A., RODRIGUEZ A., MOLINA J., SILVERIO J.C., MARINO A.P., PINTO L.M. *et al*., Long-term protective immune response elicited by vaccination with an expression genomic library of *Toxoplasma gondii*. *Infect. Immun*., 2003, **71** (9), 5407-5411.

-FATOOHI A.F., COZON G.J., GREENLAND T., FERRANDIZ J., BIENVENU J., PICOT S. *et al*., Cellular immune responses to recombinant antigens in pregnant women chronically infected with *Toxoplasma gondii. Clin. Diagn. Lab. Immunol.,* 2002, **9** (3), 704-707.

-FERMIN Z., BOUT D., RICCIARDI-CASTAGNOLI P., HOEBEKE J., Salbutamol as an adjuvant for nasal vaccination. *Vaccine.* 1999, **17** (15-16), 1936-1941.

-FORTIER B., DUBREMETZ J.F., Structure et biologie de *Toxoplasma gondii. Méd. Mal. Inf.,* 1993, **23** (spécial), 148-153.

-FOX B.A., BZIK D.J., De novo pyrimidine biosynthesis is required for virulence of Toxoplasma gondii. *Nature.* 2002, **415** (6874), 926-929.

-FRENKEL J.K., Adoptive immunity to intracellular infection. *J. Immunol.* 1967, **98** (6), 1309-1319.

-FRENKEL J.K., PFEFFERKORN E.R., SMITH D.D., FISHBACK J.L., Prospective vaccine prepared from a new mutant of Toxoplasma gondii for use in cats. *Am. J. Vet. Res.,* 1991, **52** (5), 759-763.

-FRENKEL J.K., RUIZ A., CHINCHILLA M. Soil survival of *toxoplasma* oocysts in Kansas and Costa Rica. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1975, **24** (3), 439-443.

-FREYRE A., CHOROMANSKI L., FISHBACK J.L., POPIEL I., Immunization of cats with tissue cysts, bradyzoites, and tachyzoites of the T-263 strain of Toxoplasma gondii. *J. Parasitol.,* 1993, **79** (5), 716-719.

-GARCIA J.L., Vaccination concepts against Toxoplasma gondii. *Expert Rev. Vaccines.* 2009, **8** (2), 215-225.

-GARCIA J.L., NAVARRO I.T., BIAZZONO L., FREIRE R.L., DA SILVA GUIMARÃES JUNIOR J. *et al*., Protective activity against oocyst shedding in cats vaccinated with crude rhoptry proteins of the Toxoplasma gondii by the intranasal route. *Vet. Parasitol.,* 2007, **145** (3-4), 197-206.

-GAZZINELLI R.T., HAKIM F.T., HIENY S., SHEARER G.M., SHER A., Synergistic role of CD4+ and CD8+ T lymphocytes in IFN-gamma production and protective immunity induced by an attenuated Toxoplasma gondii vaccine. *J. Immunol.* 1991, **146** (1), 286-292.

-GAZZINELLI R.T., WYSOCKA M., HIENY S., SCHARTON-KERSTEN T., CHEEVER A., KUHN R. *et al*., In the absence of endogenous IL-10, mice acutely infected with *Toxoplasma gondii* succumb to a lethal immune response dependent on CD4+ T cells and accompanied by overproduction of IL-12, IFN-γ and TNF-α. *J. Immunol*., 1996, **157** (2), 798–805.

-GRIGG M.E., GANATRA J., BOOTHROYD J.C., MARGOLIS T.P., Unusual abundance of atypical strains associated with human ocular toxoplasmosis. *J. Infect. Dis.,* 2001, **184** (5), 633-639.

-GUO H., CHEN G., LU F., CHEN H., ZHENG H. Immunity induced by DNA vaccine of plasmid encoding the rhoptry protein 1 gene combined with the genetic adjuvant of pcIFN-gamma against *Toxoplasma gondii* in mice. *Chin. Med. J. (Engl)*. 2001, **114** (3), 317-320.

-HALL B.F., JOINER K.A., Strategies of obligate intracellular parasites for evading host defences. *Immunol. Today*, 1991, **12** (3): A22-7.

-HENRIQUEZ S.A, BRETT R., ALEXANDER J., PRATT J., ROBERTS C.W. Neuropsychiatric disease and Toxoplasma gondii infection. *Neuroimmunomodulation*. 2009, **16** (2), 122-133.

-HERWALDT B.L., Laboratory-acquired parasitic infections from accidental exposures. *Clin Microbiol Rev.* 2001, **14** (4), 659-688.

-HEUSSLER V.T., KUENZI P., ROTTENBERG S., Inhibition of apoptosis by intracellular protozoan parasites. *Int. J. Parasitol.*, 2001, **31** (11), 1166-1176.

-HONORE S., COUVELARD A., GARIN Y.J., BEDEL C., HENIN D., DARDE M.L., DEROUIN F., Génotypage des souches de *Toxoplasma gondii* chez des patients immunodéprimés. *Pathol. Biol.,* 2000, **48** (6), 541-547.

-HORZINEK M.C., SCHIJNS V.E., DENIS M., DESMETTRE P., BABIUK L.A. General description of vaccines. *In*: PASTORET P.P., BLANCOU J., VANNIER P., VERSCHUEREN C., editors. *Veterinary vaccinology*. Amsterdam: Elsevier science B.V., 1997, 131-158.

-HOWE D.K., SIBLEY L.D., *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *J. Infect. Dis.*, 1995, **172**, 1561-1566.

-ISMAEL A.B., DIMIER-POISSON I., LEBRUN M., DUBREMETZ J.F., BOUT D., MEVELEC M.N., Mic1-3 knockout of Toxoplasma gondii is a successful vaccine against chronic and congenital toxoplasmosis in mice, *J. Infect. Dis.,* 2006, **194** (8), 1176-1183.

-ISMAEL A.B., SEKKAI D., COLLIN C., BOUT D., MEVELEC M.N., The MIC3 gene of Toxoplasma gondii is a novel potent vaccine candidate against toxoplasmosis. *Infect. Immun.,* 2003, **71** (11), 6222-6228.

-JOHNSON A.M., ROBERTS H., STATHAM P., MUNDAY B.L. Serodiagnosis of acute toxoplasmosis in macropods.*Vet. Parasitol.* 1989, **34** (1-2), 25-33.

-JONGERT E., DE CRAEYE S., DEWIT J., HUYGEN K., GRA7 provides protective immunity in cocktail DNA vaccines against *Toxoplasma gondii*. *Parasite Immunol.* 2007, **29** (9), 445-453.

-JONGERT E., ROBERTS C.W., GARGANO N., FORSTER-WALD E., PETERSEN E. Vaccines against *Toxoplasma gondii*: challenges and opportunities. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2009, **104** (2), 252-266.

-KASPER L.H., KHAN I.A., Role of P30 in host immunity and pathogenesis of *T.gondii* infection. *Res. Immunol.*, 1993, **144** (1)**,** 45-48.

-KOFTA W., WEDRYCHOWICZ H. C-DNA vaccination against parasitic infections: advantages and disadvantages. *Vet. Parasitol.* 2001, **100** (1-2), 3-12.

-KRINGEL H., DUBEY J.P., BESHAH E., HECKER R., URBAN J.F. Jr, CpG-oligodeoxynucleotides enhance porcine immunity to *Toxoplasma gondii*. *Vet. Parasitol.,* 2004, **123** (1-2), 55-66.

-LAPPIN M.R., Feline toxoplasmosis. *In practice*, 1999, **6**, 578-589.

-LAPPIN M.R., Immunodiagnosis and management of clinical feline toxoplasmosis. Presented at the Wisconsin Veterinary Medical Association Convention. 1994.

-LAPPIN M.R., GASPER P.W., ROSE B.J., POWELL C.C., Effect of primary phase feline immunodeficiency virus infection on cats with chronic toxoplasmosis. *Vet Immunol Immunopathol.* 1992, **35** (1-2), 121-131.

-LAPPIN M.R., GREENE C.E., PRESTWOOD A.K., DAWE D.L., MARKS A., Prevalence of *Toxoplasma gondii* infection in cats in Georgia using enzyme-linked immunosorbent assays for IgM, IgG, and antigens.*Vet Parasitol.* 1989, **33** (3-4), 225-230.

-LAPPIN M.R., MARKS A., GREENE C.E., ROSE B.J., GASPER P.W., POWEL C.C., REIF J.S., Effect of feline immunodeficiency virus infection on *Toxoplasma gondii*-specific humoral and cell-mediated immune responses of cats with serologic evidence of toxoplasmosis. *J. Vet. Intern. Med.*, 1993, **7** (2), 95-100.

-LEHMANN T., GRAHAM D.H., DAHL E., SREEKUMAR C., LAUNER F., CORN J.L. *et al*., Transmission dynamics of *Toxoplasma gondii* on a pig farm. *Infect. Genet. Evol.* 2003, **3** (2), 135-141.

-LETSCHER-BRU V., PFAFF A.W., ABOU-BACAR A., FILISETTI D., ANTONI E., VILLARD O., KLEIN J.P., CANDOLFI E.Vaccination with *Toxoplasma gondii* SAG-1 protein is protective against congenital toxoplasmosis in BALB/c mice but not in CBA/J mice. *Infect. Immun.* 2003, **71** (11), 6615-6619.

-LETSCHER-BRU V., VILLARD O., RISSE B., ZAUKE M., KLEIN J.P., KIEN T.T. Protective effect of vaccination with a combination of recombinant surface antigen 1 and interleukin-12 against toxoplasmosis in mice. *Infect. Immun.* 1998, **66** (9), 4503-4506.

-LEYVA R., HERION P., SAAVEDRA R., Genetic immunization with plasmid DNA coding for the ROP2 protein of *Toxoplasma gondii. Parasitol. Res*., 2001, **87** (1), 70-79.

-LIN D.S., BOWMAN D.D., JACOBSON R.H., Immunogical changes in cats with concurrent *Toxoplasma gondii* and feline immunodeficiency virus infections. *J. Clin. Microbiol.*, 1992, **30** (1), 17-24.

-LIND P., BUXTON D., Veterinary aspects of *Toxoplasma* infection. In "Congenital toxoplasmosis", P. Ambroise-Thomas and E.Pedersen Ed., Springer-Verlag, Paris, 2000, 261-269.

-LINDSAY D.S., COLLINS M.V., MITCHELL S.M., COLE R.A., FLICK G.J., WETCH C.N. *et al.*, Sporulation and survival of *Toxoplasma gondii* oocysts in seawater. *J. Eukaryot Microbiol.*, 2003, **50**, 687-688.

-LINDSAY D.S., DUBEY J.P., BUTLER J.M, BLAGBURN B.L. Mechanical transmission of *Toxoplasma gondii* oocysts by dogs. *Vet. Parasitol*, 1997, **73** (1-2), 27-33.

-LIU Q., GAO S., JIANG L., SHANG L., MEN J., WANG Z., ZHAI Y., XIA Z., HU R., ZHANG X., ZHU X.Q. A recombinant pseudorabies virus expressing TgSAG1 protects against challenge with the virulent *Toxoplasma gondii* RH strain and pseudorabies in BALB/c mice. *Microbes Infect.* 2008, **10** (12-13), 1355-1362.

-LUNDEN A., LOVGREN K., UGGLA A., ARAUJO F.G. Immune responses and resistance to *Toxoplasma gondii* in mice immunized with antigens of the parasite incorporated into immunostimulating complexes. *Infect. Immun.* 1993, **61** (6), 2639-2643.

-MARTENS S., PARVANOVA I, ZERRAHN J., GRIFFITHS G., SCHELL G., REICHMANN G., HOWARD J.C., Disruption of *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuoles by the mouse p47-resistance GTPases. *PLoS Pathog.*, 2005, **1** (3), e24.

-MARTIN V., SUPANITSKY A., ECHEVERRIA P.C., LITWIN S., TANOS T., DE ROODT A.R. *et al*., Recombinant GRA4 or ROP2 protein combined with alum or the gra4 gene provides partial protection in chronic murine models of toxoplasmosis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2004, **11** (4), 704-710.

-MATEUS-PINILLA N.E., DUBEY J.P., CHOROMANSKI L., WEIGEL R.M., A field trial of the effectiveness of a feline *Toxoplasma gondii* vaccine in reducing *T. gondii* exposure for swine. *J. Parasitol.*, 1999, **85** (5), 855-860.

-MATEUS-PINILLA N.E., HANNON B., WEIGEL R.M. A computer simulation of the prevention of the transmission of *Toxoplasma gondii* on swine farms using a feline *T. gondii* vaccine. *Prev Vet Med.* 2002, **55** (1), 17-36.

-Mc CABE R.E., BROOKS R.G., DORFMAN R.F., REMINGTON J.S. Clinical spectrum in 107 cases of toxoplasmic lymphadenopathy. *Rev Infect Dis.* 1987, **9** (4), 754-774.

-Mc COLGAN C, BUXTON D, BLEWETT DA. Titration of Toxoplasma gondii oocysts in non-pregnant sheep and the effects of subsequent challenge during pregnancy. *Vet. Rec.* 1988, **123** (18), 467-470.

-MENZIES F.M., HENRIQUEZ F.L., ROBERTS C.W. Immunological control of congenital toxoplasmosis in the murine model. *Immunol. Lett.* 2008, **115** (2), 83-89.

-MEVELEC M.N., BOUT D., DESOLME B., MARCHAND H., MAGNE R., BRUNEEL O., BUZONI-GATEL D. Evaluation of protective effect of DNA vaccination with genes encoding antigens GRA4 and SAG1 associated with GM-CSF plasmid, against acute, chronical and congenital toxoplasmosis in mice.*Vaccine.* 2005, **23** (36), 4489-4499.

-MEVELEC M.N., DUCOURNAU C., BASSUNY I.A., DIMIER-POISSON I., LEBRUN M., DUBREMETZ J.F., OLIVIER M., Toxo KO : Un vaccin recombinant vivant pour la prévention de la toxoplasmose congénitale de la brebis. UMR INRA-Université 0483, Immunologie Parasitaire et Vaccinologie, Biothérapies Anti-infectieuses,Tours, UMR CNRS 5203, INSERM U661, Université de Montpellier 1 et 2, Montpellier. 2008, 16p.

-MILLER M.A., MILLER W.A., CONRAD P.A., JAMES E.R., MELLI A.C., LEUTENEGGER C.M. *et al.*, Type X *Toxoplasma gondii* in a wild mussel and terrestrial carnivores from coastal California: new linkages between terrestrial mammals, runoff and toxoplasmosis of sea otters. *Int J Parasitol.* 2008, **38** (11), 1319-1328.

-MILLER C.M., SMITH N.C., JOHNSON A.M. Cytokines, nitric oxide, heat shock proteins and virulence in Toxoplasma. *Parasitol Today*. 1999, **15** (10), 418-422.

-MISHIMA M., XUAN X., YOKOYAMA N., IGARASHI I., FUJISAKI K., NAGASAWA H., MIKAMI T., Recombinant feline herpesvirus type 1 expressing *Toxoplasma gondii* ROP2 antigen inducible protective immunity in cats. *Parasitol. Res.*, 2002, **88** (2), 144-149.

-MOHAMED R.M., AOSAI F., CHEN M., MUN H.S., NOROSE K., BELAL U.S. *et al*., Induction of protective immunity by DNA vaccination with *Toxoplasma gondii* HSP70, HSP30 and SAG1 genes. *Vaccine,* 2003, **21** (21-22), 2852-2861.

-NELSON J.C., KAUFFMANN D.J., CIAVARELLA D., SENIS W.J., Acquired toxoplasmic retinochoroiditis after platelet transfusions. *Ann Ophtalmol*, 1989, **21**, 253-254.

-NIELSEN H.V., LAUEMOLLER S.L., CHRISTIANSEN L., BUUS S., FOMSGAARD A., PETERSEN E. Complete protection against lethal *Toxoplasma gondii* infection in mice immunized with a plasmid encoding the SAG1 gene. *Infect. Immun.* 1999, **67** (12), 6358-6363.

-OMATA Y., AIHARA Y., KANDA M., SAITO A., IGARASHI I., SUZUKI N., Toxoplasma gondii: experimental infection in cats vaccinated with 60Co-irradiated tachyzoites, *Vet. Parasitol.,* 1996, **65** (3-4), 173-183.

-PARMLEY S., SLIFER T., ARAUJO F., Protective effects of immunization with a recombinant cyst antigen in mouse models of infection with *Toxoplasma gondii* tissue cysts. *J. Infect. Dis*., 2002, **185** suppl. 1, S90-5.

-PARMLEY S.F., YANG S., HARTH G., SIBLEY L.D., SUCHARCZUCK A., REMINGTON J.S., Molecular characterization of a 65-kilodalton *Toxoplasma gondii* antigen expressed abundantly in the matrix of tissue cysts. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 1994, **66** (2), 283-296.

-PEARSON R.C., DHEIN C.R., GORHAM J.R. Vaccines and principles of immunization. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.*,1986, **16**, 1205-1225.

-PETROVSKY N., AGUILAR J.C. Vaccine adjuvants: current state and future trends. *Immunol. Cell. Biol.*2004, **82** (5), 488-496.

-PFEFFERKORN E.R., Interferon gamma blocks the growth of *Toxoplasma gondii* in human fibroblasts by inducing the host cells to degrade tryptophan. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984, **81** (3), 908-912.

-PLATTNER F., SOLDATI-FAVRE D., Hijacking of host cellular functions by the Apicomplexa. *Annu. Rev. Microbiol*., 2008, **62**, 471-487.

-PRELAUD P., Toxoplasmose et néosporose: actualités. *Bulletin de la Société des Vétérinaires Praticiens de France*, 1999, **83** (3), 143-152.

-RADKE J.R., WHITE M.W. Expression of herpes simplex virus thymidine kinase in Toxoplasma gondii attenuates tachyzoite virulence in mice. *Infect. Immun.* 1999, **67** (10), 5292-5297.

-RIAHI H., BOUTEILLE B., DARDE M.L.. Antigenic similarity between *Hammondia hammondi* and *Toxoplasma gondii* tachyzoites.*J Parasitol.* 1998 , **84** (3), 651-653.

-ROBERTS C.W., ALEXANDER J. Studies on a murine model of congenital toxoplasmosis: vertical disease transmission only occurs in BALB/c mice infected for the first time during pregnancy. *Parasitology*. 1992, **104**, 19-23.

-ROMMEL M., BREUNING J. Research into the occurrence of *Toxoplasma gondii* in the milk of some animals and the possibility of lactogenous infection. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* 1967, **80** (19), 365-369.

-ROQUE-RESENDIZ J.L., ROSALES R., HERION P. MVA ROP2 vaccinia virus recombinant as a vaccine candidate for toxoplasmosis . *Parasitology.* 2004; **128** (4), 397-405.

-SAGODIRA S., BUZONI-GATEL D., IOCHMANN S., NACIRI M., BOUT D. Protection of kids against *Cryptosporidium parvum* infection after immunization of dams with CP15-DNA. *Vaccine.* 1999, **17** (19), 2346-2355.

-SAITOH Y., ITAGAKI H., Dung beetles, Onthophagus spp., as potential transport hosts of feline coccidia. *Nippon Juigaku Zasshi.* 1990, **52** (2), 293-297.

-SATO K., IWAMOTO I., YOSHIKI K., Experimental toxoplasmosis in pregnant cats. *J Vet Med Sci.* 1993, **55** (6), 1005-1009.

-SCORZA T., D'SOUZA S., LALOUP M., DEWIT J., DE BRAECKELEER J., VERSCHUEREN H. *et al*.,A GRA1 DNA vaccine primes cytolytic CD8(+) T cells to control acute *Toxoplasma gondii* infection. *Infect. Immun.*, 2003, **71** (1), 309-316.

-SERGENT V. *Le rat lew, un modèle d'étude de la résistance à l'infection toxoplasmique. Analyses génétique et immunologique.* Thèse Méd. Vét. Lyon, 2002, n°166, 170p.

-SHER A., COFFMAN R.L., Regulation of immunity to parasites by T cells and T cell-derived cytokines. *Annu Rev Immunol.* 1992, **10**, 385-409.

-SHER A., HIENY S., CHAREST H., SCHARTON-KERSTEN T., COLLAZO C., GERMAIN R.N. *et al*., The role of dendritic cells in the initiation of host resistance to *Toxoplasma gondii. Adv. Exp. Med. Biol.,* 1998, **452**, 103-110.

-SKINNER L.J., TIMPERLEY A.C., WIGHTMAN D., CHATTERTON J.M., HO-YEN D.O. Simultaneous diagnosis of toxoplasmosis in goats and goatowner's family. *Scand. J. Infect. Dis*. 1990, **22** (3), 359-361.

-SKJERVE E., WALDELAND H., NESBAKKEN T., KAPPERUD G. Risk factors for the presence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in Norwegian slaughter lambs. *Prev. Vet. Med.* 1998, **35** (3), 219-227.

-SMOOKER P.M., RAINCZUK A., KENNEDY N., SPITHILL T.W., DNA vaccines and their application against parasites-- promise, limitations and potential solutions. *Biotechnol. Annu. Rev.*, 2004, **10**, 189-236.

-SPEIRS G.E., HAKIM M., CALNE R.Y., WREGHITT T.G., Relative risk of donor-transmitted *Toxoplasma gondii* infection in heart, liver and kidney transplant recipients. *Clin. Transplantation.* 1988, **2**, 257-260.

-STAHL W., TUREK G. Chronic murine toxoplasmosis: clinicopathologic characterization of a progressive wasting syndrome. *Ann Trop Med Parasitol.* 1988, **82** (1), 35-48.

-SUPPLY P., SUTTON P., COUGHLAN S.N., BILO K., SAMAN E., TREES A.J. *et al*., Immunogenicity of recombinant BCG producing the GRA1 antigen from *Toxoplasma gondii*. *Vaccine.* 1999, **17** (7-8), 705-714.

-SUZUKI Y., JOH K., ORELLANA M.A., CONLEY F.K., REMINGTON J.S., A gene(s) within the H-2D region determines the development of toxoplasmic encephalitis in mice. *Immunology,* 1991, **74** (4), 732-739.

-TENTER A.M., HECKEROTH A.R., WEISS L.M., *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int. J. Parasitol.*, 2000, **30** (12-13): 1217-1258.

-TIZARD IR. Vaccines and their production. *In: Veterinary immunology, an introduction*. 8th ed., Philadelphia: Saunders Elsevier, 2008, 574p.

-ULANOVA M., TARKOWSKI A., HAHN-ZORIC M., HANSON L.A., The Common vaccine adjuvant aluminum hydroxide up-regulates accessory properties of human monocytes via an interleukin-4-dependent mechanism. *Infect. Immun.* 2001, **69** (2), 1151-1159.

-VAN KAMPEN K.R. Recombinant vaccine technology in veterinary medicine. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.*, 2001, **31**, 535-538.

-VAN OIRSCHOT J.T., STRUBE W., BABIUK L.A., MELOEN R.H. Categories of products (mechanism of action, advantages/disadvantages). *In*: PASTORET P.P., BLANCOU J., VANNIER P., VERSCHUEREN C., editors. *Veterinary vaccinology*. Amsterdam : Elsevier science B.V., 1997, 257-308.

-VIKOREN T., THARALDSEN J., FREDRIKSEN B., HANDELAND K., Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in wild red deer, roe deer, moose, and reindeer from Norway. *Vet. Parasitol.* 2004, **120** (3), 159-169.

-WALLACE G.D. Intermediate and transport hosts in the natural history of *Toxoplasma gondii.* *Am. J. Trop. Med. Hyg.,* 1973, **22** (4), 456-464.

-WALLACE G.D. Experimental transmission of *Toxoplasma gondii* by cockroaches. *J. Infect. Dis.* 1972, **126** (5), 545-547.

-WALLACE G.D. Experimental transmission of Toxoplasma gondii by filth-flies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1971, **20** (3), 411-413.

-WALSH C.P., HAMMOND S.E., ZAJAC A.M., LINDSAY D.S., Survival of *Toxoplasma gondii* tachyzoïtes in goat milk: potential source of human toxoplasmosis. *J. Eukaryot Microbiol.,*1999, **46**, 73S-74S.

-WANG H., LIU Q., LIU K., ZHONG W., GAO S., JIANG L. *et al*.,Immune response induced by recombinant Mycobacterium bovis BCG expressing ROP2 gene of Toxoplasma gondii. *Parasitol. Int.* 2007, **56** (4), 263-268.

-WERK R., BOMMER W., Toxoplasmosis transmission by blood transfusion? *Dtsch Med Wochenschr.* 1978, **103** (41), 1598, 1601.

-WILSON D.C., MATTHEWS S., YAP G.S., IL-12 signaling drives CD8+ T cell IFN-gamma production and differentiation of KLRG1+ effector subpopulations during *Toxoplasma gondii* Infection. *J Immunol.* 2008; **180** (9), 5935-5945.

-WU H.Y., NGUYEN H.H., RUSSEL M.W., Nasal lymphoid tissue (NALT) as a mucosal immune inductive site. *Scand. J. Immunol.*, 1997, **46**, 506-513.

-YOKOYAMA N., MAEDA K., MIKAMI T. Recombinant viral vector vaccines for the veterinary use. *J. Vet. Med. Sci.* 1997, **59**, 311-322.

-ZARDI O., SOUBOTIAN B., Biology of *Toxoplasma gondii*, its survival in body tissues and liquids, risks for the pregnant woman. *Biochem. Exp. Biol.* 1979, **15** (4), 355-360.

-ZHANG J., HE S., JIANG H., YANG T., CONG H., ZHOU H. *et al*., Evaluation of the immune response induced by multiantigenic DNA vaccine encoding SAG1 and ROP2 of Toxoplasma gondii and the adjuvant properties of murine interleukin-12 plasmid in BALB/c mice. *Parasitol. Res.* 2007, **101** (2), 331-338.

-ZIMMERMANN S., DALPKE A., HEEG K., CpG oligonucleotides as adjuvant in therapeutic vaccines against parasitic infections. *Int. J. Med. Microbiol.*, 2008, **298** (1-2), 39-44.

<u>ANNEXE 1</u>: Résistance des différentes formes de *Toxoplasma gondii* (*Euzeby J., 1998* ; *AFSSA, 2005*).

	Pseudokystes et tachyzoïtes	**Kystes à bradyzoïtes**	**Ookystes sporulés**
Chaleur (cuisson)	Sensibles (30 min à 50°C, *Dubey J.P. et al., 1970a*)	Sensibles (15 min à 56,6°C, *Dubey J.P. et al., 1990*)	Sensibles (1 min à 60°C, *Dubey J.P., 1998*)
Dessiccation	Sensibles	Sensibles	Sensibles
Congélation	Résistants (+/-)	Sensibles (3 jours à -12C°, *Dubey J.P., 1988*)	Peu sensibles
Désinfectants	Sensibles		Résistants (sauf au formol à 0,3 % et à l'ammoniac à 10%)
Suc gastrique	Sensibles (+/-)	Résistants	Résistants
Putréfaction	Sensibles	Résistants	Sensibles
Pasteurisation	Sensibles (*Tenter A.M. et al., 2000*)		
Ionisation à 1 kGy		Sensibles (*Smith J.L., 1992*)	

<u>ANNEXE 2</u>: Durée d'infectiosité des ookystes de *Toxoplasma gondii* dans certaines conditions environnementales (*AFSSA, 2005*).

Température (°C)	Conditions	Durée de survie [a]	Réferences
En laboratoire			
-20	Eau	14–28 j[b]	Frenkel et Dubey, 1973; Kutičič et Wikerhauser, 1996
-10/-5	Eau	106 j	Dubey, 1998a
0	Eau	13 mo[b]	Dubey, 1998a
+4	Suspensions fécales Dépôts de fèces Eau Sur des baies	183–410 j[c] 214–410 j[c] 54 mo 56 j	Yilmaz et Hopkins, 1972 Yilmaz et Hopkins, 1972 Dubey, 1998a Kniel et al., 2002
+4/24	Eau de mer 15 ppt	180 j	Lindsay et al. 2003
+10/+25	Eau	200 j	Dubey, 1998b
+22.5	Eau Suspensions fécales Dépôts de fèces	306–410 j[c] 153–410 j[c] 107–306 j[c]	Yilmaz et Hopkins, 1972 Yilmaz et Hopkins, 1972 Yilmaz et Hopkins, 1972
+23/29	Sols humides	117 j	Dubey et al., 1970a
+30	Eau	107 j	Dubey, 1998a
+35	Eau	32 j[c]	Dubey, 1998a
+37	Eau Suspensions fécales Dépôts de fèces	91–306 j[c] 46–199 j[c] 30–153 j[c]	Yilmaz et Hopkins, 1972 Yilmaz et Hopkins, 1972 Yilmaz et Hopkins, 1972
+40	Eau	9 j	Dubey, 1998b
+45	Eau	1 j	Dubey, 1998a
+50	Eau	30–60 min[b]	Dubey et al., 1970a; Dubey, 1998b
+55/+58	Eau	< 15 min	Kutičič et Wikerhauser, 1996; Dubey, 1998a
+60/+70	Eau	< 1 min	Dubey, 1998a
Dans l'environnement			
-20/+35	Dépôts de fèces dans le sol	18 mo	Frenkel et al., 1975
-6/+39	Eau Suspensions fécales Dépôts de fèces	122–306 j / 153–410 j[d] 76–306 j / 91–306 j[d] 46–183 j / 76–334 j[d]	Yilmaz et Hopkins, 1972 Yilmaz et Hopkins, 1972 Yilmaz et Hopkins, 1972
+15/+30	Dépôts de fèces dans le sol	56–357 j	Frenkel et al., 1975
+20/+27	Sol humide	106 j	Ruiz et al., 1973

(d'après Dumètre, 2003)

[a] infectivité globale de la suspension d'oocystes évaluée par bio-essais chez la souris.

[b] abréviations: j, jours; mo, mois; min, minutes.

[c] 1ers nombres = durée de l'infectivité des oocystes dans des suspensions non couvertes – 2èmes nombres = durée de l'infectivité des oocystes dans des suspensions couvertes.

[d] suspensions non couvertes (1ers nombres) et couvertes (2èmes nombres) exposées au soleil / ou placées à l'ombre.

<u>ANNEXE 3</u>: Synthèse actualisée des recommandations de prévention de la toxoplasmose chez la femme enceinte (*AFSSA, 2005*)

Recommandations indispensables		Précisions
Hygiène personnelle	Se laver les mains : - surtout après avoir manipulé de la viande crue, des crudités souillées par de la terre ou avoir jardiné, - avant chaque repas.	Brossage des ongles recommandé.
Hygiène domestique	Porter des gants pour jardiner ou pour tout contact avec de la terre.	
	Faire laver chaque jour, par une autre personne, le bac à litière du chat avec de l'eau bouillante, ou porter des gants.	Faire particulièrement attention aux jeunes chats, surtout s'ils chassent, et aux chats errants.
Hygiène alimentaire	Bien cuire tout type de viande (y compris la volaille et le gibier). En pratique, une viande bien cuite a un aspect extérieur doré, voire marron, avec un centre rose très clair, presque beige et ne laisse échapper aucun jus rosé.	Une viande bien cuite correspond à une température à coeur comprise entre 68 et 72°C. Eviter la cuisson des viandes au four à micro-ondes.
	Lors de la préparation des repas, laver à grande eau les légumes et les plantes aromatiques, surtout s'ils sont terreux et consommés crus.	Précautions particulièrement renforcées pour les végétaux constamment souillés par de la terre et consommés crus: radis, salade, fraises, champignons.
	Laver à grande eau les ustensiles de cuisine ainsi que les plans de travail.	
Recommandations complémentaires		**Précisions**
Congélation	La congélation des denrées d'origine animale à des températures inférieures à –18°C (surgélation) permet la destruction des kystes, et peut être proposée comme recommandation complémentaire de prévention.	
Repas en dehors du domicile	Ne consommer de viande que bien cuite. Eviter les crudités. Préférer les légumes cuits.	
Autres recommandations (relevant de la précaution)		**Précisions**
Aliments déconseillés	Lait de chèvre cru.	Risque exceptionnel mais avéré.
	Viande marinée, saumurée ou fumée.	Risque potentiel.
	Huîtres, moules et autres mollusques consommés crus.	Risque hypothétique à confirmer.

ANNEXE 4: Séroprévalences de l'infection à *Toxoplasma gondii* chez les chats dans le monde (1990-2000) (*Tenter A.M. et al., 2000*).

Country	Year of sampling[a]	Seroprevalence (%)[b]	Number of samples tested (*n*)[b]	Method[c]	Reference
Pet cats					
Argentina	1993	20	169	IHAT	[598]
Brazil	1996–97	18	248	IFAT	[599]
Chile	< 1992	40	65	IHAT	[600]
France	< 1997	43	519	IFAT	[401]
	< 1998	43	506	IFAT	[561]
Germany	1989–90	46	231	IFAT	[601]
	1989–90	31–47**	218*	ELISA	[602]
	1989–90	34–51**	218*	IFAT	[602]
	1992–94	34–61**	465*	ELISA	[603]
Italy	1996	9	113	IFAT	[564]
Japan	1994–95	9	471	LAT	[604]
	< 1998	6	800	LAT	[605]
Mexico	< 1999	71	24	ELISA	[606]
Singapore	< 1992	7	15	LAT	[607]
Sweden	1986–87	42	241	ELISA	[542]
Taiwan	< 1990	8	117	ELISA	[608]
Turkey	1994	43	65	SFDT	[609]
USA (Oklahoma)	1987–88	22	618	LAT	[610]
Stray or feral cats					
Australia	< 1997	50	18	LAT	[611]
	< 1999	40	103	ELISA	[612]
Bangladesh	1995	33	24	LAT	[282]
Brazil	< 1999	73	173	IFAT	[557]
Germany	1989–90	66	61	IFAT	[601]
	1989–90	58	88	ELISA	[602]
	1989–90	56	88	IFAT	[602]
	1992–94	59	112	ELISA	[603]
	1998	66	259	ELISA	[613]
Italy	< 1997	33	490	ELISA	[614]
	< 1997	33	490	DAT	[614]
Japan	1990–91	19	231	LAT	[615]
Korea	< 1999	13	198	ELISA	[131]
Singapore	< 1992	31	706	LAT	[607]
United Kingdom (Oxfordshire)	< 1996	62	45	IHAT	[616]
USA					
Illinois	1992–93	68	391	MAT	[452]
Iowa	< 1992	42	74	MAT	[459]
Turkey	< 1995	70	53	IHAT	[617]
Not classified					
Argentina	1988–94	61	145	IFAT	[552]
	< 1997	35	55	IFAT	[618]
Austria	< 1996	48	456	IFAT	[114]
Czech Republic	1995–97	59	390	IFAT	[619]
Japan	1989–91	11	726	LAT	[620]
Panama	1990–92	32–61**	141*	DAT	[155]
Poland	1992–96	71	357	DAT	[621]
Slovenia	< 1997	70	54	IFAT	[622]
	< 1997	59	54	ELISA	[622]
	< 1997	57	54	DAT	[622]
Turkey	< 1998	56	36	SFDT	[623]
	< 1998	38	24	SFDT	[624]
United Kingdom (Scotland)	< 1993	19*	158	–	[625]
USA	< 1992	74	124	ELISA	[626]

[a] Years of sampling are listed as published in the references. In cases where this information was not available, the year listed here is the year when the study was published, as indicated by ' < '. Data from the 1980s are included if the study was published in the 1990s and if no recent data were available for the area.

[b] Figures marked with '*' were calculated from the published data. Seroprevalences marked with '**' varied with the type of keeping or the year of examination.

[c] DAT, direct agglutination test; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; IFAT, indirect immunofluorescent antibody test; IHAT, indirect haemagglutination test; LAT, latex agglutination test; MAT, modified agglutination test; SFDT, Sabin–Feldman dye test; –, not reported.

<u>ANNEXE 5</u>: Tableau récapitulatif des études de vaccination avec des protéines de *Toxoplasma gondii* (*Jongert et al., 2009*).

Immunization with protein vaccines against *Toxoplasma gondii*

Antigen	Antigen delivery	Protection endpoint		Mouse strain	*T. gondii* challenge strain	Study
		Survival/control (%)	Cyst reduction (%)			
SAG1, ap	Protein + CFA, ip/sc	10-21/55-42	NA	BALB/c and CD1	CS, ip	Kasper et al. 1985
SAG1, ap	Protein + liposomes	93/27	NA	Swiss-webster	C, ip	Bülow et al. 1991
SAG1, ap	Protein + QuilA, intranasal	90/0	100 in CD1	CD1	ME-49 (II)	Khan et al. 1991
		33/0	survivors	C57BL/6	tissue cysts, oral	Khan et al. 1991
		67/0		A/J	tissue cysts, oral	Khan et al. 1991
$SAG1_{48-67}$	Peptide + IFA	0/0	NA	Swiss OF1	76K (II) tissue cysts, oral	Darcy et al. 1992
F3G3, ap	Protein + IFA, ip	100/0	NA	Swiss-Webster	C56 (III) tachyzoites, ip	Brinkmann et al. 1993
SAG1, ap	Protein + CT, intranasal	NA	80-85	CBA/J	76K (II) tissue cysts, oral	Debard et al. 1996
$SAG1_{123-165}$	Peptide + FCA, sc	NA	35	CBA/J	76K (II) tissue cysts, oral	Velge-Roussel et al. 1997
SAG1, rec	Protein + IL-12, sc	NA	40	CBA/J	PRU (II) tissue cysts, oral	Letscher-Bru et al. 1998
GRA4, rec	Protein + CT, oral	0-17/0	66	C57BL/6	76K (II) tissue cysts, oral	Mévélec et al. 1998
SAG1, rec	Protein + Alum	44/20	NA	NMRI	RH (I) tachyzoites, ip	Petersen et al. 1998
SAG1, ap	Protein + CT, intranasal	NA	50-60	CBA/J	76K (II) tissue cysts, oral	Velge-Roussel et al. 2000
SAG1, rec	Protein + LT, intranasal	NA	75-78	CBA/J	76K (II) tissue cysts, oral	Bonenfant et al. 2001
SAG1	Protein + FCA/IFA, ip	0/0	NA	BALB/c	Beverley (II), ip	Mishima et al. 2001a
SAG2		17/0	100	BALB/c	Beverley (II), ip	Mishima et al. 2001a
SAG3		0/0	NA	BALB/c	Beverley (II), ip	Mishima et al. 2001a
SRS1		25/0	100	BALB/c	Beverley (II), ip	Mishima et al. 2001a
P54		8/0	100	BALB/c	Beverley (II), ip	Mishima et al. 2001a
SAG1 + SAG2 + SAG3 + SRS1 + P54		18/0	100	BALB/c	Beverley (II), ip	Mishima et al. 2001a
SAG1, rec	Protein, sc	NA	Congential 33/72	BALB/c	ME49 (II) tissue cysts, oral	Letscher-Bru et al. 2003
			Congenital 53/32	CBA/J	ME49 (II) tissue cysts, oral	Letscher-Bru et al. 2003
GRA4 + ROP2, rec	Protein + Alum	NA	± 55	C57BL/6	ME49 (II) tissue cysts, oral	Martin et al. 2004
		NA	± 37	C3H/HeN	ME49 (II) tissue cysts, oral	Martin et al. 2004
SAG1-SAG2, rec	Protein, ip	73/0	NA	BALB/c	RH (I), tachyzoites, ip	Yang et al. 2004
ROP2-HSP83 (*Leishmania infantum*)	Protein, fp	0/0	NA ± 33	BALB/c	ME49 (II) tissue cysts, oral	Echeverria et al. 2006
		0/0	± 85	C57BL/6	ME49 (II) tissue cysts, oral	Echeverria et al. 2006
		NA		C3H/HeN	ME49 (II) tissue cysts, oral	Echeverria et al. 2006
SAG1	Peptides +	Yes	NA	C3H/HeN	RH, ip	Siachoque et al. 2006
MIC1, MIC4, ap	Protei, sc	80/0	68%	C57BL/6	ME49 (II) tissue cysts, oral	Lourenço et al. 2006

Antigen	Antigen delivery	Protection endpoint		Mouse strain	*T. gondii* challenge strain	Study
		Survival/control (%)	Cyst reduction (%)			
GRA2, rec	Protein, MPL sc	NA	69.8%	CBA/J	PRU (II) tissue cysts, ip	Golkar et al. 2007
GRA6, rec		NA	± 25%	CBA/J	PRU (II) tissue cysts, ip	Golkar et al. 2007
GRA2 + GRA6, rec		NA	48.2	CBA/J	PRU (II) tissue cysts, ip	Golkar et al. 2007
SAG1 + GRA1 + MAG1, rec	Protein, FCA	NA	89%	BALB/c	DX (II) tissue	Gatkowska et al. 2008
GRA5 + GRA7 + ROP2, rec	Protein, CT intranasal	NA	0%	BALB/c	VEG (III) tissue cysts, oral	Igarashi et al. 2008
TgPI-1, rec	Protein	90/50	58%	C3H/HeN	ME-49 (II) tissue cysts, oral	Cuppari et al. 2008
EC2(MIC2-MIC3-SAG1), rec + GRA7, rec	Protein + GERBU, im	NA	60-79%	Swiss OF1	76K (II) tissue cysts, oral	Jongert et al. 2008b

ap: affinity purified; chr: chromatography; CT: cholera toxin/toxoid; FCA: Freund's Complete Adjuvant; fp: foot pad; gg: gene gun; IFA: Freund's incomplete adjuvant; im: intramuscular; ip: intraperitoneal; iv: intravenous; NA: not addressed; rec: recombinant; sc: subcutaneous; +/++/+++ = enhanced survival.

<u>ANNEXE 6</u>: Tableau récapitulatif des études utilisant des plasmides pour délivrer des antigènes de *Toxoplasma gondii* (vaccins ADN) (*Jongert et al., 2009*).

Antigen	Antigen delivery	Protection endpoint		Mouse strain	*T. gondii* challenge strain	Study
		Survival/control (%)	Cyst reduction (%)			
SAG1	Plasmid, im	100/30	NA	C3H/HeN	RH (I) tachyzoites, ip	Nielsen et al. 1999
		8/20	NA	BALB/c	RH (I) tachyzoites, ip	Nielsen et al. 1999
SAG1	Plasmid, im	90-100/0	70	C57BL/6	ME-49 (II) tissue cysts, oral	Angus et al. 2000
		0/0	NA	C57BL/6	RH (I) tachyzoites, ip	Angus et al. 2000
GRA4	Plasmid, im	62/0	NA	C57BL/6	76K (II) tissue cysts, oral	Desolme et al. 2000
GRA4 + GM-CSF	Plasmid, im	75/0	NA	C57BL/6	76K (II) tissue cysts, oral	Desolme et al. 2000
GRA4 + IL-12	Plasmid, im	25/0	NA	C57BL/6	76K (II) tissue cysts, oral	Desolme et al. 2000
GRA1	Plasmid, im	70/10	54	C3H/HeN	IPB-G (II) tissue cysts, oral	Vercammen et al. 2000
		No protection	NA	C57BL/6 and BALB/c	IPB-G (II) tissue cysts, oral	Vercammen et al. 2000
GRA7		90/10	63	C3H/HeN	IPB-G (II) tissue cysts, oral	Vercammen et al. 2000
		No protection	NA	C57BL/6 and BALB/c	IPB-G (II) tissue cysts, oral	Vercammen et al. 2000
ROP2		90/10	67	C3H/HeN	IPB-G (II) tissue cysts, oral	Vercammen et al. 2000
		No protection	NA	C57BL/6 and BALB/c	IPB-G (II) tissue cysts, oral	Vercammen et al. 2000
ROP2	Plasmid, im	0/0	NA	BALB/c	RH (I) tachyzoites, ip	Leyva et al. 2001
SAG1	Plasmid, im	67/25 Survival pups	100 infected pups:	BALB/c	Beverley (II) tissue cysts, oral	Couper et al. 2003
		77 (vacc)/71 (cntrl)	43 (vacc)/32 (cntrl)	BALB/c	Beverley (II) tissue cysts, oral	Couper et al. 2003
MIC3	Plasmid, im	NA	45-58	CBA/J	76K (II) tissue cysts, oral	Ismael et al. 2003
MIC3 + GM-CSF	Plasmids, im	NA	67-74	CBA/J	76K (II) tissue cysts, oral	Ismael et al. 2003
Genetic library	Plasmid, im	0/0	NA	BALB/c	RH (I) tachyzoites, ip	Fachado et al. 2003a
SAG1 + ROP2	Plasmids, im	0/0	NA	BALB/c	RH (I) tachyzoites, ip	Fachado et al. 2003b
GRA1	Plasmid, im	75-100/0-25	NA	C3H/HeN	IPB-G (II) tissue cysts, ip	Scorza et al. 2003
GRA4	Plasmid, im	NA	± 50	C3H/HeN	ME49 (II) tissue cysts, oral	Martin et al. 2004
		NA	± 50	C57BL/6	ME49 (II) tissue cysts, oral	Mohamed et al. 2003
HSP-70	Plasmid, gg	NA	Yes	C57BL/6	ME49 (II) tissue cysts, oral	Mohamed et al. 2003
HSP30		NA	Yes	BALB/C	ME49 (II) tissue cysts, oral	Mohamed et al. 2003
SAG1		NA	Yes	BALB/C	ME49 (II) tissue cysts, oral	Mohamed et al. 2003
MIC2 + MIC3 + MIC4 + M2AP + AMA1	Plasmid, id	NA	84	BALB/c	SSII19 tissue cysts, oral	Beghetto et al. 2005
GRA4	Plasmid, im	62/0	NA	C57BL/6	76K (II) tissue cysts, oral	Mévélec et al. 2005
SAG1		62/0	NA	Swiss OF1	76K (II) tissue cysts, oral	Mévélec et al. 2005
SAG1 + GRA4		75/0	NA	Swiss OF1	76K (II) tissue cysts, oral	Mévélec et al. 2005

Antigen	Antigen delivery	Protection endpoint		Mouse strain	*T. gondii* challenge strain	Study
		Survival/control (%)	Cyst reduction (%)			
SAG1 + GRA4 + GM-CSF	Plasmids, im	87/0	NA	Swiss OF1	76K (II) tissue cysts, oral	Mévélec et al. 2005
			≈ 66	Swiss OF1	76K (II) tissue cysts, oral	Mévélec et al. 2005
SAG1 + GRA4 + GM-CSF		NA	Less infected/ dead pups/litter	Swiss OF1	76K (II) tissue cysts, oral	Mévélec et al. 2005
MAG1 + BAG1	Plasmids, im	NA	62	C3H/HeN	SSI119 tissue cysts, oral	Nielsen et al. 2006
MIC2	Plasmid, id	37.5/0; 40/0,	NA	C57BL/6 and BALB/c	Beverly (II) tissue cysts, oral	Dautu et al. 2007
M2AP		0/0	NA	C57BL/6 and BALB/c	Beverly (II) tissue cysts, oral	Dautu et al. 2007
AMA1		37.5/0; 60/0	NA	C57BL/6 and BALB/c	Beverly (II) tissue cysts, oral	Dautu et al. 2007
BAG1		12.5/0	NA	C57BL/6 and BALB/c	Beverly (II) tissue cysts, oral	Dautu et al. 2007
GRA1 + GRA7 + ROP2	Plasmids, im	100/44	81-84	C3H/HeN	76K (II) tissue cysts, oral	Jongert et al. 2007
GRA1 + GRA7			89	C3H/HeN	76K (II) tissue cysts, oral	Jongert et al. 2007
GRA7 + ROP2			79	C3H/HeN	76K (II) tissue cysts, oral	Jongert et al. 2007
GRA1 + ROP2			57	C3H/HeN	76K (II) tissue cysts, oral	Jongert et al. 2007
GRA1			31	C3H/HeN	76K (II) tissue cysts, oral	Jongert et al. 2007
GRA7			80	C3H/HeN	76K (II) tissue cysts, oral	Jongert et al. 2007
ROP2			43	C3H/HeN	76K (II) tissue cysts, oral	Jongert et al. 2007
SAG1-ROP2		0+/0	NA	BALB/c	RH (I) tachyzoites, ip	Zhang et al. 2007a
SAG1-ROP2 + IL-12	Plasmid, im	0++/0	NA	BALB/c	RH (I) tachyzoites, ip	Zhang et al. 2007a
GRA4	Plasmid, gg	71/28	NA	C57BL/6	PLK (II), ip	Zhang et al. 2007b
GRA4 heterologous	Plasmid, vaccinia, gg	100/28	NA	C57BL/6	PLK (II), ip	Zhang et al. 2007
SAG1-ROP2	Plasmid, im	0/0	NA	BALB/c	RH (I) tachyzoites, ip	Xue et al. 2008a
SAG1-ROP2+CT		0/0	NA	BALB/c	RH (I) tachyzoites, ip	Xue et al. 2008a
SAG1-ROP2+IL-12		0+/0	NA	BALB/c	RH (I) tachyzoites, ip	Xue et al. 2008a
SAG1-ROP2	Plasmid, im	0+/0	NA	BALB/c	RH (I) tachyzoites, ip	Xue et al. 2008b
SAG1-GRA2		0+/0	NA	BALB/c	RH (I) tachyzoites, ip	Xue et al. 2008b
SAG1-ROP2-GRA2		0++/0	NA	BALB/c	RH (I) tachyzoites, ip	Xue et al. 2008b
SAG1-ROP2-GRA2 + IL-12		0+++/0	NA	BALB/c	RH (I) tachyzoites, ip	Xue et al. 2008b
SAG1-ROP2-SAG2	Plasmid, im	0+/0	NA	BALB/c	RH (I) tachyzoites, ip	Cui et al. 2008
SAG1-ROP2-SAG2 + IL-12		0+/0	NA	BALB/c	RH (I) tachyzoites, ip	Cui et al. 2008
SAG1-GRA1-ROP2-GRA4	Plasmid, im	0+/0	NA	BALB/c	RH (I) tachyzoites, ip	Cong 2008
		20+/0	NA	BALB/c	RH (I) tachyzoites, ip	Cong 2008
SAG1-GRA1-ROP2-GRA4-CT		20+/0	NA	BALB/c	RH (I) tachyzoites, ip	Cong 2008

<u>ANNEXE 7</u>: Tableau récapitulatif des études utilisant des vecteurs vivants atténués pour délivrer des antigènes de *Toxoplasma gondii* (*Jongert et al., 2009*).

Antigen	Antigen delivery	Protection endpoint		Mouse strain	*T. gondii* challenge strain	Study
		Survival/control (%)	Cyst reduction (%)			
SAG1	RMA.S cell line	40/0	NA	C57BL/6	RH (I) tachyzoites, ip	Aosai et al. 1999
GRA1	BCG	13/0	NA	Swiss-OF1	76K (II), oral	Supply et al. 1999
ROP2	MVA	0/0, +	None	Swiss	RH (I) tachyzoites, ip Me49	Roque-Resendiz et al. 2004
SAG1-SAG2-CT	*S. typhimurium*, oral	40/0	NA	BALB/c	RH (I) tachyzoites, ip	Cong et al. 2005
SAG1, SAG2, SAG3	Adenovirus	0/0	NA	BALB/c	RH (I) tachyzoites, ipP-Br	Caetano et al. 2006
		NA	80%	BALB/c	RH (I) tachyzoites, ipP-Br	Caetano et al. 2006
GRA4	Vaccinia, gg	14/28	NA	C57BL/6	PLK (II), ip	Zhang et al. 2007b
ROP2	BCG	0/0, +	NA	BALB/c	RH (I) tachyzoites, ip	Wang et al. 2007
SAG1	*S. typhimurium*, oral	80-90/0	NA	ICR	RH (I) tachyzoites, ip	Qu et al. 2008
SAG1	Pseudorabies virus, im	60/0	NA	BALB/c	RH (I) tachyzoites, ip	Liu et al. 2008

gg = gene gun; ip = intraperitoneal; im = intramuscular; NA = not adressed; +/++/+++ = enhanced survival.

ANNEXE 8: Séroprévalences annuelles par espèces et classes d'animaux testés durant l'étude de Mateus-Pinilla, 1999 (*Mateus-Pinilla N.E. et al., 1999)*

		Baseline 1992 or 1993		Intervention period 1994		1995		Evaluation period 1996		
Species/class	Farm	n	Positive (%)	n	Positive (%)	n	Positive (%)	n	Positive (%)	Change* (%)
Sows	1	89	3.37	30	53.3	31	9.68	30	10	6.63
	2	90	23.33	30	3.33	30	43.33	30	6.67	−16.67
	3	56	8.93	—	—	—	—	—	—	—
	4	61	26.23	31	32.26	30	20.00	27	29.63	3.4
	5	90	25.30	30	20.00	30	13.33	31	3.23	−21.22
	6	19	0.00	13	15.38	11	63.64	—	—	—
	7	93	22.58	30	40.00	30	26.67	30	20	−2.58
	8	30	6.67	30	0.00	31	19.35	30	3.33	−3.33
P value†										0.28
Finishing pigs	1	89	2.25	90	0.0	90	1.1	90	2.22	−0.02
	2	91	2.20	90	0.0	94	1.1	90	2.22	0.02
	3	89	6.76	90	5.6	50	30.0	90	1.11	−5.59
	4	91	2.20	90	6.7	90	45.6	90	1.11	−1.09
	5	89	2.20	91	0.0	89	1.1	90	0.00	−2.20
	6	80	1.30	90	0.0	67	4.5	—	—	—
	7	90	14.4	90	1.1	92	3.3	90	0.00	−14.4
	8	90	5.60	92	0.0	93	0.0	89	1.12	−4.48
P value†										0.02
Adult cats	1	4	100.0	4	100.0	3	100	2	100.0	0.00
	2	13	84.6	3	66.7	8	87.5	0	—	—
	3	8	50.0	12	8.3	1	100.0	0	—	—
	4	4	75.0	5	80.0	1	100.0	0	—	—
	5	2	100.0	2	100.0	2	50.0	4	50.0	−50.0
	6	12	91.7	9	66.7	4	75.0	—	—	—
	7	4	75.0	14	85.7	10	70.0	4	75.0	0.00
	8	19	100.0	11	54.5	6	66.7	2	100.0	0.00
P value†										0.5
Juvenile cats	1	3	33.3	4	0.0	2	0.0	0		—
	2	2	50.0	6	16.7	5	100.0	2	100.0	50.0
	3	0	—	8	0.0	0	—	0	—	—
	4	1	0.0	0	—	3	66.7	2	0.0	0.00
	5	0	—	2	0.0	1	100.0	0	—	—
	6	2	100.0	5	0.0	0	—	—	—	—
	7	6	100.0	28	32.1	14	7.1	13	15.4	−84.62
	8	8	50.0	0		6	66.7	2	0.0	−50.0
P value†										0.38
Mice	1	31	0.0	22	4.5	21	0.0	24	0.0	0.00
	2	15	6.7	32	0.0	27	0.0	56	0.0	−6.67
	3	7	14.3	5	0.0	10	0.0	27	0.0	−14.29
	4	5	0.0	14	14.3	15	0.0	9	0.0	0.00
	5	6	0.0	8	0.0	9	0.0	28	0.0	0.00
	6	15	0.0	7	0.0	3	0.0	—	—	—
	7	9	11.1	25	4.0	7	0.0	3	0.0	−11.11
	8	5	0.0	2	0.0	12	0.0	6	0.0	0.00
P value†										0.13

* A decrease in the prevalence (from 1992/1993 to 1996) for a particular farm is indicated with a negative sign.
† One-tailed *P* value: Wilcoxon paired sample test.

<u>ANNEXE 9</u>: Tableau récapitulatif des essais vaccinaux contre *Toxoplasma gondii* menés sur souris *(Garcia, 2009)*

Study (year)	Animal	Antigen and adjuvant	Route of immunization	Challenge	Aim	Results
McLeod *et al.* (1988)	Swiss-Webster	ts4 (temperature-sensitive mutant)	sc. or ii.	p.o. 200 cysts Me49 strain	Congenital protection	Neonates from sc.-vaccinated dams were not protected. ii.-immunized mice had partial protection against congenital infection (36%)
Bulow and Boothroyd (1991)	Swiss-Webster (6–8 weeks)	Purified P30 (SAG1) plus liposomes	ip.	ip. 105 tachyzoites C strain	Mortality	Only 7% of the mice died compared with 73% of the control group
Darcy *et al.* (1992)	OF1 (8–10 weeks)	SAG1 purified by HPLC, MAP constructs and ESA	sc.	p.o. 1200 cysts 76K strain	Mortality	Monomeric SAG1 did not protect against challenge and 40% of mice vaccinated with MAP survived up to 75 d.a.i.
Bourguin *et al.* (1993)	C57BL/6 (8–10 weeks)	TSo (RH strain) plus CT	p.o.	p.o. 90 cysts 76K strain 18 d.a.c.	Brain cyst burden	The percentage of survival was greater in the group that received TSo plus CT
Roberts *et al.* (1994)	BALB/c (6–8 weeks)	STAg plus NISV	sc.	p.o. 20 cysts RRA strain	Congenital protection	All pups from vaccinated dams survived into maturity
Debard *et al.* (1996)	CBA/J (8–10 weeks)	SAG1 purified plus CT	in.	p.o. 100 cysts 76K strain	Brain cyst burden	Strong resistance to brain cyst formation
Dubey *et al.* (1996)	Swiss-webster	α-irradiated oocysts	p.o.	p.o. decreasing dose of oocysts VEG strain	Mortality and brain cyst burden	Partial protection in the mortality and tissue cyst formation
Petersen *et al.* (1998)	NMRI (8 weeks)	Recombinant SAG1	sc.	sc. 100 cysts SSI119 strain	Mortality and brain cyst burden	The survival rate was higher in the mice immunized; however, there was no difference in cyst burden
Supply *et al.* (1999)	OF1 (7–8 weeks)	BCG plus GRA1	ip.	p.o. 1000 cysts 76K strain	Mortality	There was a slight delay in the mortality of vaccinated animals

BCG: Bacille Calmette-Guérin; CLN: Cervical lymph node; CT: Cholera toxin; d.a.c.: Days after challenge; d.a.i.: Days after infection; EC2: Chimeric protein encoding fragments of MIC2, MIC3 and SAG1; ESA: Excreted–secreted antigens; Exo-Tag: Exosomes secreted by dendritic cells pulsed *in vitro* with *Toxoplasma*-derived antigens; FCA: Freund's complete adjuvant; FIA: Freund's incomplete adjuvant; GERBU: Adjuvant based on cationic lipid solid nanoparticles and glycopeptides derived from *Lactobacillus bulgaricus* cell wall; GRA: Dense granule antigen; ii.: Intraintestinal; im.: Intramuscular; in.: Intranasal; ip.: Intraperitoneal; iv.: Intravenous; LT: Heat-labile enterotoxin (LTR72 and LTK63 mutants); MAP: Multiple antigenic peptide; MIC: Microneme protein; MLN: Mesenteric lymph nodes; NISV: Nonionic surfactant vesicle; OF1: Oncins France 1; pIL-12: Plasmid-encoding IL-12; p.o.: Per oral; ROP2: Rhoptry 2 protein; SAG: Surface antigen; sc.: Subcutaneous; STAg: Soluble tachyzoites antigen; TSo: Tachyzoites sonicated.

Vercammen *et al.* (2000)	C57BL/6, BALB/c, C3H (6 weeks)	Plasmid plus GRA1, GRA7 and ROP2	im.	p.o. 10–200 cysts IPB-G and 76K strains	Mortality and brain cyst burden	C3H mice showed partial protection against lethal challenge and lower brain cysts. DNA vaccination did not protect BALB/c and C57BL/6 mice
Desolme *et al.* (2000)	C57BL/6 (6–8 weeks)	Plasmid plus GRA4	im.	p.o. 40 cysts 76K strain	Mortality and brain cyst burden	Immunization resulted in 62% of survival. All control mice died after challenge
Velge-Roussel *et al.* (2000)	CBA/J	Passive transfer of CLN or MLN lymphoid cells from mice in. vaccinated with SAG1 plus CT	iv.	p.o. 80 cysts 76K strain	Brain cyst burden	Mice immunized exhibited 50% (MLN) and 60% (CLN) fewer cysts than control mice
Leyva *et al.* (2001)	BALB/C, C57BL/6, CBA/J	Plasmid plus ROP2 and ts4	im. and ip.	sc. 6×10^3 tachyzoites RH strain	Mortality	Mice immunized with plasmid did not resist to challenging while mice vaccinated with ts4 resisted. Death was delayed in the BALB/c group
Bonenfant *et al.* (2001)	CBA/J	SAG1 plus CT, LT, LTR72 or LTK63	in.	p.o. 70 cysts 76K strain	Brain cyst burden	A significant smaller cysts were observed in immunized animals (LTR72: 77; LTK63: 78; LT: 75; and CT: 85% protection)
Daryani *et al.* (2003)	BALB/c (8–10 weeks)	ESAs plus FCA and FIA	sc.	sc. 2×10^3 tachyzoites RH strain	Mortality	Significant protection of mice immunized with ESAs
Roque-Reséndiz *et al.* (2004)	Swiss-Webster	Vaccinia virus strain plus ROP2	im.	ip. 300 tachyzoites RH strain p.o. 20 cysts Me49 strain	Mortality and brain cyst burden	The vaccine increased the life-expectancy; however, it did not reduce the number of parasites in the brain
Martin *et al.* (2004)	C57BL/6, C3H	rROP2, rGRA4, mix rROP2 and rGRA4 plus alum plasmid plus GRA4	im.	p.o. 20–100 cysts Me49 strain	Mortality and brain cyst burden	Plasmid and rGRA4 plus alum showed a similar protective level. rROP2 only conferred protection to C3H mice
Beguetto *et al.* (2005)	BALB/c	Plasmids plus MIC2a, MIC2b, MIC3, MIC4, M2AP and AMA1	im.	p.o. 30 cysts SSI119	Brain cyst burden	Immunization reduced 84% of brain cyst burden compared with the control group

BCG: Bacille Calmette-Guérin; CLN: Cervical lymph node; CT: Cholera toxin; d.a.c.: Days after challenge; d.a.i.: Days after infection; EC2: Chimeric protein encoding fragments of MIC2, MIC3 and SAG1; ESA: Excreted–secreted antigens; Exo-Tag: Exosomes secreted by dendritic cells pulsed *in vitro* with *Toxoplasma*-derived antigens; FCA: Freund's complete adjuvant; FIA: Freund's incomplete adjuvant; GERBU: Adjuvant based on cationic lipid solid nanoparticles and glycopeptides derived from *Lactobacillus bulgaricus* cell wall; GRA: Dense granule antigen; ii.: Intraintestinal; im.: Intramuscular; in.: Intranasal; ip.: Intraperitoneal; iv.: Intravenous; LT: Heat-labile enterotoxin (LTR72 and LTK63 mutants); MAP: Multiple antigenic peptide; MIC: Microneme protein; MLN: Mesenteric lymph nodes; NISV: Nonionic surfactan

Dimier-Poisson *et al.* (2006)	C57BL/6 8–10 weeks)	*Toxoplasma gondii* RNA	in.	p.o. 15–40 cysts 76K strain	Mortality and brain cyst burden	Vaccinated mice were protected in both lethal and sublethal challenge
Beauvillain *et al.* (2007)	CBA/J, C57BL/6	Exo-TAg	iv.	p.o. 30–80 cysts 76K strain	Mortality and brain cyst burden	CBA/J mice and C57BL/6 mice showed fewer cysts and survival rates than controls, respectively
Zhang *et al.* (2007)	BALB/c	Multiantigenic DNA vaccine (pSAG1-ROP2)	im.	ip. 104 tachyzoites RH strain	Mortality	Vaccinated mice showed higher survival rates plus pIL-12
Jongert *et al.* (2007)	C3H/HeN	Cocktail DNA vaccine (pGRA1, pGRA7 and pROP2)	im.	p.o. 20–100 cysts 76K strain	Tested immunity conferred by cocktail of DNA vaccines	Animals that received pGRA7 had optimal protection
Igarashi *et al.* (2008)	BALB/c	rROP2, rGRA5 and rGRA7 plus CT	in.	p.o. 50 cysts VEG strain	Brain cyst burden	Mice vaccinated had a partial protection against cyst formation (58%)
Cuppari *et al.* (2008)	C3H/HeN	RTgPI-1 plus Al2O3	im.	p.o. 20–50 cysts ME49 strain	Mortality and brain cyst burden	Partial protection
Jongert *et al.* (2008)	Swiss	rEC2 + rGRA7 plus GERBU; rEC2 + pGRA7 plus GERBU	im.	p.o. 20 cysts 76K strain	Evaluate protein–protein and protein–DNA vaccine	Protein–protein vaccine conferred better protection than protein–DNA vaccine
Qu *et al.* (2008)	ICR mice	DNA vaccine delivery in attenuated *Salmonella typhimurium* (pSAG1)	p.o.	ip. 500 tachyzoites RH strain	Mortality	Orally vaccinated animals were better protected than unvaccinated animals

BCG: Bacille Calmette-Guérin; CLN: Cervical lymph node; CT: Cholera toxin; d.a.c.: Days after challenge; d.a.i.: Days after infection; EC2: Chimeric protein encoding fragments of MIC2, MIC3 and SAG1; ESA: Excreted–secreted antigens; Exo-Tag: Exosomes secreted by dendritic cells pulsed *in vitro* with *Toxoplasma*-derived antigens; FCA: Freund's complete adjuvant; FIA: Freund's incomplete adjuvant; GERBU: Adjuvant based on cationic lipid solid nanoparticles and glycopeptides derived from *Lactobacillus bulgaricus* cell wall; GRA: Dense granule antigen; ii.: Intraintestinal; im.: Intramuscular; in.: Intranasal; ip.: Intraperitoneal; iv.: Intravenous; LT: Heat-labile enterotoxin (LTR72 and LTK63 mutants); MAP: Multiple antigenic peptide; MIC: Microneme protein; MLN: Mesenteric lymph nodes; NISV: Nonionic surfactant vesicle; OF1: Oncins France 1; pIL-12: Plasmid-encoding IL-12; p.o.: Per oral; ROP2: Rhoptry 2 protein; SAG: Surface antigen; sc.: Subcutaneous; STAg: Soluble tachyzoites antigen; TSo: Tachyzoites sonicated.

<u>ANNEXE 10</u>: Tableau récapitulatif des essais vaccinaux contre *Toxoplasma gondii* menés sur animaux autres qu'animaux de laboratoire (*Jongert et al., 2009*).

Antigen	Antigen Delivery	Protection endpoint/negative control group (%)	Animal	*T. gondii* challenge strain	Study
S48, bradyzoites deficient strain, live tachyzoites	im	72-80/17 viable lambs, almost 66 of viable lambs were infected	sheep	Oocysts, orally	Buxton et al. 1991
$GRA1_{170-193}$	Peptide+FCA/IFA, iv	50/0 survival	fisher rats	RH (I) tachyzoites, ip	Duquesne et al. 1991
TS-4 tachyzoites	sc	19++/0 survival 1/25 foetuses infected with TS-4 during pregnancy	*Aotus* monkeys	T265, T163	Escajadillo & Frenkel 1991
T263, oocyst deficient strain, live bradyzoites	oral	84 of cats protected from oocyst shedding	cat	T265, oral	Frenkel et al. 1991
GRA1	BCG	No difference in febrile response	sheep	76K (II), oral	Supply et al. 1999
GRA2, GRA5, chr	Protein+IFA, sc	64-69 reduction in foetal infection	fisher rats	76K (II) tissue cysts, oral	Zenner et al. 1999
SAG1+GM-CSF	Plasmid, im	60 brain cyst reduction	sprague-dawley rats	VEG (III) oocysts, oral	Angus et al. 2000
ROP2	Feline herpesvirus, in	100/0 *Toxoplasma* free brain, oocyst shedding not affected	cat	Beverley (II) tissue cysts, oral	Mishima et al. 2002a, b
RH Tachyzoites	IFA + CpG, im	52/0 *Toxoplasma* free	pig	VEG (III) oocysts, oral	Kringel et al. 2004
RH tachyzoites	PLG microspheres, intranasal	no protection	sheep	M3 oocysts, oral	Stanley et al. 2004
LIV-5 rhoptry extract RH tachyzoites, live	ISCOM, sc im	20/0 *Toxoplasma* free 30/0 *Toxoplasma* free	pig	VEG (III) oocysts, oral	Garcia et al. 2005
SAG1	Protein	lower C56 parasite load in circulation and brain; lower 76K parasite load in lungs	guinea pig	C56 (III) tachyzoites ip, 76K (II) tissue cysts oral	Flori et al. 2006
LIV-5 tachyzoites ropthry extract	QuilA, in	67 of cats protected from oocyst shedding	cat	VEG (III) tissue cysts, oral	Garcia et al. 2007
GRA1 + GRA7 + GM-CSF	Plasmid, id	67/0 *Toxoplasma* free	pig	76K (II) tissue cysts, ip	Jongert et al. 2008b

id: intradermal; in: intranasal; im: intramuscular; iv: intravenous; sc: subcutaneous

PLACE DU CHAT DANS LA CIRCULATION DE LA TOXOPLASMOSE.
OBJECTIFS, INTERET ET ETAT DES LIEUX DE LA VACCINATION.

NOM et Prénom : DION Soline

Résumé

La toxoplasmose est une zoonose mondiale dont les impacts en santé humaine et vétérinaire peuvent être importants et variables selon les régions. Pourtant, les mesures prophylactiques s'y rapportant sont peu développées. Cette étude s'intéresse au rôle du chat dans la transmission horizontale de cette parasitose complexe et tente d'évaluer la pertinence de la mise en place d'une prophylaxie vaccinale féline avec les moyens actuels et futurs.

Une première partie fait le point sur l'état des connaissances concernant le cycle, la biologie et les impacts en santé animale et humaine du parasite *Toxoplasma gondii*.

La seconde partie s'intéresse au statut particulier du chat, hôte définitif du parasite, longtemps considéré à ce titre comme principale source de contamination humaine.

Enfin, la problématique de la vaccination féline est abordée et donne lieu, lors d'une troisième partie, à un recensement des différents vaccins existants ainsi que des potentiels outils vaccinaux à l'étude.

Mots clés : TOXOPLASMOSE, TOXOPLASMA GONDII, VACCINATION, PROPHYLAXIE, ZOONOSE, SANTE PUBLIQUE VETERINAIRE, HOTE DEFINITIF, CARNIVORE, CHAT

Jury :

Président : Pr.
Directeur : Dr. HALOS
Assesseur : Dr. FREYBURGER

Adresse de l'auteur :

DION Soline, 2 rue Pierre Curie, 94360 BRY-SUR-MARNE

CATS INVOLVEMENT IN THE CIRCULATION OF TOXOPLASMOSIS. OBJECTIVES, BENEFITS AND STATUS OF VACCINATION.

SURNAME : DION

Given name : Soline

Summary

Toxoplasmosis is a worldwide zoonosis whose impact on human and animal health is considerable in some areas. However, prophylactic measures against toxoplasmosis are poorly developed. This survey focuses on the role played by cats in the horizontal transmission of this complex parasitosis and attempts to evaluate the relevance of prophylactic vaccination of cats with existing vaccines and vaccines under development.

The first part is a review of current knowledge on the life cycle and biology of *Toxoplasma gondii* and its impact on animal and human health.

The second part outlines the special status of cats as definitive host of the parasite, long-considered for that reason as the major source of human contamination.

The third part deals with vaccination of cats against toxoplasmosis and reviews existing vaccines as well as vaccines under development.

Keywords: TOXOPLASMOSIS, TOXOPLASMA GONDII, VACCINATION, DISEASE PREVENTION, ZOONOSIS, VETERINARY PUBLIC HEALTH, DEFINITIVE HOST, CARNIVORE, CAT

Jury :

President : Pr.
Director : Dr. HALOS
Assessor : Dr. FREYBURGER

Author's address:

DION Soline, 2 rue Pierre Curie, 94360 BRY-SUR-MARNE