

VACCINATION CONTRE LA TOXOPLASMOSE CHEZ LES ANIMAUX DE RENTE

VACCINATION AGAINST TOXOPLASMOSIS IN FARM ANIMALS

Par Nathalie MOIRÉ⁽¹⁾, Marie-Noëlle MÉVÉLEC, Céline DUCOURNEAU et Isabelle DIMIER-POISSON
(Communication présentée le 18 décembre 2008)

RÉSUMÉ

La toxoplasmose est une zoonose mondialement répandue. Chez l'homme, elle apparaît après l'ingestion de viandes insuffisamment cuites d'animaux contaminés. Chez le mouton et la chèvre, elle est à l'origine de nombreux avortements. Une étude approfondie de sa séroprévalence chez les différentes espèces animales peut permettre de mieux informer les consommateurs et ainsi de limiter les risques de transmission. La vaccination des animaux semble être une alternative intéressante puisqu'elle pourrait diminuer la transmission à l'homme mais également prévenir les avortements chez les brebis. L'utilisation d'une souche naturelle de *Toxoplasma gondii* incomplète, présentant une virulence atténuée, a montré son efficacité dans la protection contre l'avortement des brebis. Cependant, sa virulence n'est pas bien contrôlée, et le risque de réversion vers la forme virulente existe. Les techniques de biologie moléculaire ont permis d'obtenir des souches atténuées par la délétion de gènes ciblés, qui ne sont pas susceptibles de retrouver leur virulence d'origine. L'une d'elles, appelée Mic1-3KO, a montré son efficacité dans un modèle murin contre la toxoplasmose chronique et congénitale. Elle est également efficace contre la toxoplasmose congénitale chez la brebis. Cette démarche vaccinale reste prometteuse. De plus, l'utilisation du toxoplasme comme vecteur vaccinal reste une perspective intéressante, puisque ce parasite est capable d'exprimer des protéines étrangères.

Mots-clés: *Toxoplasma gondii*, toxoplasmose congénitale, vaccination, souche vaccinale vivante atténuée, avortement.

SUMMARY

Toxoplasmosis is a worldwide zoonotic disease caused by the protozoa Toxoplasma gondii. It is transmitted to man by the ingestion of contaminated and undercooked meat. In sheep and goats, toxoplasmosis causes numerous abortions. A thorough analysis of the seroprevalence of toxoplasmosis in different animal species will help consumer information and thus limit the risks of transmission. The vaccination of farm animals may help reduce the transmission to man, as well as prevent abortion in ewes. A naturally attenuated live T. gondii vaccine is available for the prevention of abortions in ewes, but its virulence is not fully controlled, and there is a risk of reversion to a pathogenic strain. Molecular biology techniques have led to the development of attenuated strains through the deletion of targeted genes, which are unlikely to revert to their initial virulence. A strain called Mic1-3KO was shown to be effective against congenital and chronic toxoplasmosis in mice. It is also effective against congenital toxoplasmosis in ewes. This vaccine approach remains promising.

Key words: *Toxoplasma gondii*, congenital toxoplasmosis, vaccination, live attenuated strain, abortion.

(1) Université François Rabelais, INRA UMR 483 Université-INRA d'Immunologie Parasitaire et Vaccinologie, Biothérapie anti-infectieuse, IFR agents transmissibles et infectiologie, UFR de Pharmacie, Parc Grandmont, 37200 Tours. France.

INTRODUCTION

Toxoplasma gondii est un protozoaire parasite intracellulaire obligatoire. Il est capable d'infecter toutes les espèces à sang chaud avec une forte prévalence. Le cycle biologique de *T. gondii* se divise en deux parties, un cycle sexué dans l'épithélium intestinal de l'hôte définitif (chat et autres félinés) et un cycle asexué chez l'hôte intermédiaire (toutes espèces à sang chaud). Chez l'hôte définitif, le cycle se déroule dans les entérocytes et aboutit à l'excrétion d'ocystes dans l'environnement. Après sporulation, les ocystes renferment deux sporocystes contenant chacun quatre sporozoïtes. Les hôtes intermédiaires se contaminent par l'ingestion des ocystes sporulés, présents sur des végétaux, dans l'eau et plus généralement dans l'environnement. Les sporozoïtes sont infectieux et après ingestion, ils se transforment en tachyzoïtes, formes répliquatives du parasite. Les tachyzoïtes se multiplient par division dans les cellules hôtes au sein d'une vacuole parasitophore. Après plusieurs cycles de division, les tachyzoïtes font éclater leurs cellules hôtes et se propagent dans les cellules adjacentes. Les tachyzoïtes infectent rapidement les organes adjacents, puis des organes plus distants : chez la souris infectée par ingestion d'ocystes, des tachyzoïtes sont retrouvés dans le cerveau six jours après l'infection (Dubey 1998). Après quelques cycles de division et sous la pression du système immunitaire, les tachyzoïtes donnent naissance aux bradyzoïtes contenus dans des kystes tissulaires. Ces kystes sont source de contamination des carnivores et des humains par l'ingestion de viandes infectées. Par contre, les herbivores s'infectent en consommant des végétaux souillés par les ocystes. Le toxoplasme peut être transmis de l'hôte définitif à l'hôte intermédiaire et vice versa.

LA TOXOPLASMOSE CHEZ LES ANIMAUX

Les cibles du Toxoplasme

Tous les animaux à sang chaud y compris les oiseaux peuvent s'infecter. Les kystes se développent sept jours après l'ingestion d'ocystes ou de kystes. Les moutons, les chèvres et les porcs sont les animaux d'élevage chez lesquels le plus grand nombre de kystes sont retrouvés. Les bovins ne présentent que rarement de kystes, alors que la séroprévalence est forte chez ces animaux (*tableau 1*) et dans les conditions d'infection naturelle, aucun

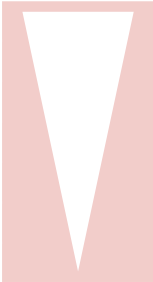
Animaux	Séroprévalence ^a (%)	Isolement de parasite ^b	Fréquence des kystes
Moutons	35,9	+	
Porcs	6,8	+	
Chèvres	33,4	+	
Gibier	55,8	+	
Chevaux	25,8	+	
Poulets	10,4	+	
Bovins	33,6	-	

Tableau 1 : Séroprévalence moyenne dans diverses espèces animales.

a : Séroprévalence moyenne ;

b : Parasites vivants détectés dans des conditions d'infections naturelles dans différents tissus testés. (d'après Tenter et al. 2000 et Kijlstra & Jongert, 2008).

parasite vivant n'a été retrouvé chez cette espèce. Le déclin de la séroprévalence chez l'homme corrélé à celui chez les animaux de rente est en faveur de la prépondérance de la contamination humaine par la voie alimentaire. Les végétariens stricts présentent une séroprévalence moins élevée. En France, la contamination humaine serait principalement due à la consommation de viande de mouton, alors qu'aux USA elle serait due à celle de viande de porc (Dubey & Jones, 2008).

Chez le mouton et la chèvre, *Toxoplasma gondii* est responsable d'avortements et de mortalité néo-natale : les pertes annuelles sont estimées à 1,25 million d'agneaux en Europe (Innes et al. 2007). Chez le mouton non immun, de nombreux tissus sont infectés et des kystes sont retrouvés dans le cerveau, le cœur, les muscles, le foie, l'intestin. Si l'infection survient pendant la gestation, les tachyzoïtes franchissent la barrière placentaire et infectent le fœtus. Après une phase aiguë, une infection latente et une immunité concomitante se développent.

Les différentes souches de Toxoplasme

Les premières études de génotypage des souches de *T. gondii* ont été effectuées sur des isolats provenant de France et des USA et avaient conduit à la description de trois types I, II et III, génétiquement peu différents (Howe et al. 1996). Ces génotypes sont associés à des phénotypes particuliers et entre autre, à des virulences différentes chez la souris.

Les souches de type I, représentées par la souche RH, sont virulentes chez les souris. Elles entraînent une phase aiguë de la maladie, due à la dissémination rapide du parasite dans les tissus, et la mort soudaine de la souris, même après l'infection par un seul parasite, quelle que soit la lignée de souris utilisée. Les souches de type II, représentées par la souche ME49, sont dites avirulentes. Elles provoquent, avec de fortes doses d'infection, une mortalité moindre. Les souches de type III sont de virulence intermédiaire. L'analyse d'un plus grand nombre d'échantillons d'origine géographique plus diversifiée et l'augmentation du nombre de marqueurs génétiques utilisés pour le génotypage ont mis en évidence une diversité génétique plus importante que celle décrite à l'origine. Il existe des recombinaisons entre les trois types (type I/III) et des lignées dites atypiques dans lesquelles la majorité des allèles ne correspondent pas à ceux des trois types classiques (Dardé, 2008).

La répartition géographique et la prévalence des différentes souches de *T. gondii* retrouvées chez les animaux sont présentées dans le *tableau 2*. Les souches de type II sont principalement identifiées en Europe et aux USA, aussi bien chez les humains que chez la plupart des animaux (moutons, poulets) testés. Ces souches sont à l'origine, en Europe, de 80 % des cas de toxoplasmose congénitale humaine et sont isolées principalement chez les patients atteints du SIDA. En Afrique, on a surtout identifié, chez les quelques cas humains étudiés, des souches issues de recombinaisons entre les génotypes de types I et III (type I/III). Les toxoplasmoses oculaires acquises sont pour la plupart dues à des souches de type I ou de type I/III. En Amérique du Sud, les souches atypiques et recombinantes semblent être les plus représentées.

Elles ont été isolées chez différents animaux (poulet, chat, cheval), chez un jaguar en Guyane française et aussi chez des patients immunocompétents en Guyane, lors de cas de toxoplasmose humaine sévère (Carme *et al.* 2002). Récemment, de telles souches ont été également identifiées chez environ 40 % des moutons testés aux USA (Dubey *et al.* 2008). En France, un cas exceptionnel de réinfection survenue chez une mère qui avait été immunisée avant la conception a été décrit (Elbez-Rubinstein *et al.* 2009). Elle s'était réinfectée vraisemblablement après la consommation de viande de cheval importée. La souche isolée à partir du sang du nouveau-né présentait un génotype atypique, très peu fréquent en Europe, qui avait été décrit en Amérique du Sud. Cette étude indique que l'immunité acquise contre des souches européennes de *Toxoplasma* pourrait ne pas protéger contre la réinfection par des souches atypiques transmises lors de voyages hors de l'Europe ou par la consommation de viande importée.

Bien qu'il n'y ait pour l'instant aucun lien bien établi entre les différents génotypes et leur virulence chez l'homme, ces cas de toxoplasmose sévère chez des patients immunocompétents doivent être considérés avec attention.

LA VACCINATION CHEZ LES ANIMAUX

La stratégie vaccinale repose sur le fait qu'une primo-infection induit une immunité protectrice à vie, aussi bien chez l'homme que chez l'animal. La vaccination des chats et des animaux destinés à la consommation pourrait être une des solutions pour diminuer le risque d'infection humaine.

La plupart des essais de vaccination ont été effectués chez la souris, soit avec des extraits parasitaires, des parasites vivants atténués, différentes protéines du parasite, soit par injection des protéines purifiées, de protéines recombinantes, ou de l'ADN correspondant (revue dans Bhopale 2003).

Génotype	Prévalence chez les différents animaux	Pathologie humaine associée	Origine géographique
Type I	11 à 70 % poulets (Amérique du sud), porc (USA).	Toxoplasmose oculaire acquise.	
Type II	80-100 % moutons, 85 % chats (Europe), poulets (Égypte).	Toxoplasmose congénitale, Toxoplasmose des patients atteints de SIDA.	Europe et Amérique du Nord.
Type III	80 % porcs (USA), 27 à 83 % poulets (Amérique du sud).	Toxoplasmose congénitale ? (rare)	
Type I/III		Toxoplasmose oculaire acquise.	Afrique, Amérique du sud.
Atypique	Poulets, chats, chevaux (Amérique du sud), moutons (USA), jaguar (Guyane française).	Toxoplasmose sévère chez l'immunocompétent.	Amérique du sud.

Tableau 2 : Répartition géographique et prévalence chez les différentes espèces animales des différentes souches de *T. gondii*.

La réponse cellulaire joue un rôle primordial dans les mécanismes effecteurs de la résistance à *T. gondii*, même si localement, les immunoglobulines A ont un rôle important dans la limitation de l'invasion des cellules épithéliales. Ces études fondamentales ont permis de préciser les réponses immunitaires impliquées dans la protection et en particulier ont montré la part déterminante de l'interféron γ (IFN γ) dans cette protection.

Vaccination par des parasites vivants

Plusieurs études de vaccination ont également été menées chez les animaux de rente et chez les chats.

Les premiers essais de vaccination ont été effectués chez les moutons avec des parasites tués, sans résultat avérés chez les brebis gestantes (Buxton 1993). Par contre, l'injection de souches vivantes de toxoplasme, comme la souche RH ou la souche vivante incomplète S48, provoque la réduction de la charge parasitaire chez des porcs et prévient les avortements chez les brebis (Dubey *et al.* 1991 ; Buxton 1993). Chez le porc, des adjuvants ont été utilisés pour diminuer la dose de tachyzoïtes vivants injectés : des doses de 1000 tachyzoïtes, injectées avec des oligonucléotides comme adjuvant, ont induit une protection d'environ 50 % de l'effectif traité (Kringel *et al.* 2004).

Chez le mouton et la chèvre, le vaccin composé de la souche S48 réduit de 70 à 80 % les avortements, par rapport à des troupeaux témoins. Ce vaccin est commercialisé (Ovilis, Toxovax, Intervet) et utilisé dans les pays où les risques d'avortement dus à la toxoplasmose sont grands (Innes & Vermeulen, 2006). L'injection de ce vaccin ne conduit pas à la formation de bradyzoïtes et prévient la formation de kystes. Il est utilisé chez l'animal mais possède cependant plusieurs inconvénients. Il n'empêche pas la transmission verticale du parasite aux agneaux. Il est peu stable, sa durée de vie ne dépassant pas deux à trois semaines. Les animaux récemment vaccinés ne peuvent être consommés à cause d'une possible transmission des tachyzoïtes. De plus, la virulence de cette souche naturelle n'est pas bien contrôlée et le risque de réversion existe.

Les techniques de biologie moléculaire ont permis, en supprimant des gènes ciblés, d'obtenir des souches de virulence atténuée, qui ne sont pas susceptibles de retrouver leur virulence d'origine. Une de ces souches a été obtenue par délétion des gènes *MIC1* et *MIC3* de la souche virulente RH. Ces gènes codent des protéines de micronèmes, impliquées dans l'adhésion des parasites à la cellule-hôte (Cérède *et al.* 2005). Une infection d'épreuve par des kystes d'une souche de type II, chez la souris, a provoqué une protection vis-à-vis de la toxoplasmose aussi bien chronique que congénitale. Toutes les souris immunisées montrent une très forte réduction de la charge parasitaire dans le cerveau. Il y a une augmentation très significative de la survie des nouveau-nés (100 % contre 60 % chez les témoins non vaccinés) et une forte réduction de la transmission materno-fœtale, puisque le taux de souriceaux infectés est de 33 % chez les témoins contre 4 % chez les souriceaux de mères vaccinées (Ismael *et al.* 2006).

Des expériences sur les brebis montrent également une protection contre la toxoplasmose abortive. Les brebis vaccinées à l'aide de cette souche, sont totalement protégées contre les

avortements dits « précoces » (c'est-à-dire dans les 15 jours après l'infection) et la protection globale contre les avortements est de 60 à 90 % selon les expériences après une infection d'épreuve par des oocystes (M. N. Mévélec, comm. pers.).

Les vaccins moléculaires

Plusieurs candidats vaccins ont été identifiés. Il s'agit tout d'abord des antigènes majeurs de surface du tachyzoïte comme SAG1, SAG2 et SAG3, ainsi que des protéines des organites du complexe apical comme les molécules de granule dense comme GRA1, 4, 7 et de rhoptrie comme ROP2. Ces vaccins montrent des protections partielles, mais significatives chez la souris et sont beaucoup moins efficaces que les vaccins vivants atténués.

L'utilisation de protéines purifiées à partir de tachyzoïtes ou de vaccins ADN est également testée chez les animaux de rente et les chats. Le principe de la vaccination ADN consiste à injecter non pas la protéine vaccinale mais l'ADN correspondant. L'injection de l'ADN dans le muscle strié aboutit à l'expression de la protéine correspondante dans les myocytes du lieu d'injection.

L'utilisation de broyat de parasites (contenant un mélange de protéines parasitaires) encapsulé dans des micro- ou nanoparticules induisent une réponse immunitaire chez le mouton mais pas de protection après un challenge (Stanley *et al.* 2004). Récemment,

des protéines purifiées, associées à un adjuvant, ont été administrées à des chats par voie nasale, entraînant une bonne protection contre l'excrétion d'oocystes, puisque deux chats sur trois testés n'en sécrétaient pas. Cependant, malgré ces bons résultats, ces études restent à confirmer car les effectifs par lot sont très faibles (trois chats/lot) (Garcia *et al.* 2007).

Des résultats de protection très encourageants ont été obtenus après la vaccination de porcs par un mélange de deux protéines sous forme de vaccin ADN. Deux porcs sur trois ont été complètement protégés après challenge et ne présentaient pas de parasites au niveau du muscle cardiaque, mais les effectifs restent faibles (trois porcs/lot).

Pour l'instant, les vaccins atténués obtenus par génie génétique restent une des solutions les plus intéressantes pour la vaccination des animaux de rente. Ils sont efficaces et induisent une immunité comparable à une infection naturelle. La réversion de virulence de ces souches peut être contrôlée. De plus, *T. gondii* a été montré comme pouvant exprimer de nombreuses protéines étrangères. Cela laisse donc la possibilité d'utiliser les souches vivantes atténuées comme vaccins vecteurs en faisant exprimer des protéines d'autres apicomplexes (comme *Neospora caninum*) ou des antigènes bactériens ou viraux entraînant également des avortements chez le mouton comme par exemple l'agent responsable de la fièvre Q.

BIBLIOGRAPHIE

- Bhopale, G.M. 2003. Development of a vaccine for toxoplasmosis: current status. *Microbes Infect.* 5: 457-462.
- Buxton D. 1993. Toxoplasmosis: The first commercial vaccine. *Parasitol Today* 9: 335-337.
- Carme, B., Bissuel, F., Ajzenberg, D., Bouyne, R., Aznar, C., Demar, M., Bichat, S., Louvel, D., Bourbigot, A. M., Peneau, C., Neron, P., Dardé, M.L. 2002 Severe acquired toxoplasmosis in immunocompetent adult patients in French Guiana. *J Clin Microbiol.* 40: 4037-4044.
- Céréde, O., Dubremetz, J.F., Soëte, M., Deslée, D., Vial, H., Bout, D., Lebrun, M. 2005. Synergistic role of micronemal proteins in *Toxoplasma gondii* virulence. *J Exp Med.* 201: 453-463.
- Dardé, M. L. 2008. *Toxoplasma gondii*, new genotypes and virulence. *Parasite.* 15: 366-371.
- Dubey, J.P. 1998. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol.* 28: 1019-1024.
- Dubey, J.P., Urban Jr., J. F., Davis, S. W. 1991. Protective immunity to toxoplasmosis in pigs vaccinated with a non persistent strain of *Toxoplasma gondii*. *Am J Vet Res.* 52: 1316-1319.
- Dubey, J.P. & Jones J. L. 2008. *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States. *Int. J Parasitol.* 38: 1257-1278.
- Dubey, J.P., Sundar, N., Hill, D., Velmurugan, G.V., Bandini, L.A., Kwok, O.C.H., Majumbar, D., Su, C. 2008. High prevalence and abundant atypical genotypes of *Toxoplasma gondii* isolated from lambs destined for human consumption in the USA. *Int J Parasitol.* 38: 999-1006.
- Elbez-Rubinstein, A., Azjenberg, D., Dardé, M.L., Cohen, R., Dumètre, A., Year, H., Gondon, E., Janaud, J. C., Thulliez, P. 2009. Congenital toxoplasmosis and reinfection during pregnancy: case report, strain characterization, experimental model of reinfection, and review. *J Infect Dis.* 199 (2):280-285. DOI: 10.1086/595793.
- Garcia, J.L., Navarro, I.T., Biazzone, L., Freire, R.L., Guimaraes, J.D., Cryssafidis, A.L., Bugni, F.M., Leme da Cunha, I.A., Hamada, F.N., Ferreira Diaz, R.C. 2007. Protective activity against oocyst shedding in cats vaccinated with crude rhoptry proteins of the *Toxoplasma gondii* by the intranasal route. *Vet Parasitol.* 145: 197-206.
- Howe, D., Summers, K., Sibley, D. 1996. Acute virulence is associated with markers on chromosome VIII in *Toxoplasma gondii*. *Inf Immun.* 64: 5193-5198.
- Innes, E. A. & Vermeulen, A. N. 2006. Vaccination as a control strategy against the coccidial parasites. *Eimeria, Toxoplasma and Neospora.* *Parasitology.* 133: S145-S168.
- Innes, E. A., Bartley, P. M., Maley, S. M., Wright, S. E., Buxton, D. 2007. Comparative host-parasite relationships in ovine and bovine neosporosis and strategies for vaccination. *Vaccine.* 25: 5495-5503.
- Ismael, A. B., Dimier-Poisson, I., Lebrun, M., Dubremetz, J. F., Bout, D., Mévélec, M. N. 2006. Mic1-3Knockout of *Toxoplasma gondii* is a successful vaccine against chronic and congenital toxoplasmosis in mice. *J Infect Dis.* 194: 1176-1183.
- Jongert, E., Melkebeek, V., De Craye, S., Dewit, J., Verhelst, D., Cox, E. 2008. An enhanced GRA1-GRA7 cocktail DNA vaccine primes anti-toxoplasma immune responses in pigs. *Vaccine.* 26: 1025-1031.
- Kijlstra, A. & Jongert, E. 2008. Toxoplasma-safe meat: close to reality? *Trends in Parasitol.* DOI:10.1016/j.pt.2008.09.008.
- Kringel, H., Dubey, J.P., Beshah, E., Hecker, R., Urban Jr., J. F. 2004. *Vet Parasitol.* 123: 55-66.
- Stanley, A. C., Buxton, D., Innes E. A., Huntley, J. F. 2004. Intranasal immunization with *Toxoplasma gondii* tachyzoite antigen encapsulated into PLG microspheres induces humoral and cell-mediated immunity in sheep. *Vaccine.* 22: 3929-3941.
- Tenter, A. M., Heckeroth, A. R., Weiss, L. M. 2000. *Toxoplasma gondii* : from animals to humans. *Int J Parasitol.* 30: 1217-1258.