



Vaccination contre la toxoplasmose : réalités et perspectives

Sophie Dunand

► To cite this version:

Sophie Dunand. Vaccination contre la toxoplasmose : réalités et perspectives. Sciences pharmaceutiques. 2000. dumas-01317415

HAL Id: dumas-01317415

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01317415>

Submitted on 18 May 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il n'a pas été réévalué depuis la date de soutenance.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact au SID de Grenoble : **thesebum@ujf-grenoble.fr**

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

<http://www.cfcopies.com/juridique/droit-auteur>

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



1^{er} exemplaire

**UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE**

ANNEE : 2000

N° D'ordre : 7045

**Vaccination contre la
Toxoplasmose
Réalités et perspectives**

THESE

PRESENTEE POUR L'OBTENTION
DU DOCTORAT EN PHARMACIE

DIPLOME D'ETAT

Par

SOPHIE DUNAND

[Données à caractère personnel]

THESE SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE : 12/12/2000 à 16H00

DEVANT LE JURY COMPOSE DE :

Madame PINEL Claudine : Président du jury

Madame FRICKER-HIDALGO Hélène : Praticien hospitalier

Mademoiselle MOREL Sophie : Pharmacien d'officine

Madame Bret Danièle : Pharmacien d'officine

**UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE**

ANNEE : 2000

N° D'ordre :

**Vaccination contre la
Toxoplasmose
Réalités et perspectives**

THESE

PRESENTEE POUR L'OBTENTION
DU DOCTORAT EN PHARMACIE

DIPLOME D'ETAT

Par

SOPHIE DUNAND

[Données à caractère personnel]

THESE SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE : 12/12/2000 à 16H00

DEVANT LE JURY COMPOSE DE :

Madame PINEL Claudine : Président du jury

Madame FRICKER-HIDALGO Hélène : Praticien hospitalier

Mademoiselle MOREL Sophie : Pharmacien d'officine

Madame Bret Danièle : Pharmacien d'officine



UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE
Domaine de la Merci 38700 LA TRONCHE

Doyen de la Faculté

M. le Professeur P. DEMENGE

Vice Doyen

M. le Professeur J. CALOP

PROFESSEURS DE PHARMACIE

ALARY	Josette	Chimie Analytique
BAKRI	Abdelaziz	Pharmacie Galénique
BENOIT-GUYOD	Jean-Louis	Chimie Toxicologie et Eco- toxicologie
CALOP	Jean	Pharmacie Clinique et Bio- technique
CUSSAC	Max	Chimie Thérapeutique
DECOUT	Jean-Luc	Chimie Générale
DEMENGE	Pierre	Physiologie/Pharmacologie
DROUET	Emmanuel	Microbiologie-Immunologie
FAVIER	Alain	Biochimie
GOULON	Chantal	Physique-Pharmacie
GRILLOT	Renée	Parasitologie
MARIOTTE	Anne-Marie	Pharmacognosie
RIBUOT	Christophe	Physiologie-Pharmacologie
ROUSSEL	Anne-Marie	Biochimie
SEIGLE-MURANDI	Françoise	Botanique et Cryptogamie
STEIMAN	Régine	Biologie Cellulaire
WOUESSIDJEW	Denis	Pharmacie Galénique

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE
Domaine de la Merci 38700 LA TRONCHE

Doyen de la Faculté

M. le Professeur P. DEMENGE

Vice Doyen

M. le Professeur J. CALOP

MAITRES DE CONFÉRENCE DE PHARMACIE

ALDEBERT	Delphine	Parasitologie
ALLENET	Benoît	Pharmacie Clinique
BARTOLI	Marie-Hélène	Pharmacie Clinique et Biotech.
BOUMENDJEL	Ahcène	Pharmacognosie
BURMEISTER	Wilhelm	Physique
CARON	Cécile	Biologie Moléculaire
CHARLON	Claude	Chimie Pharmacie
DELETRAZ	Martine	Droit Economie pharmaceutique
DIJOUX-FRANCA	M.-Geneviève	Pharmacognosie
DURMORT-MEUNIER	Claire	Virologie moléculaire structur
ESNAULT	Danielle	Chimie Analytique
FAURE	Patrice	Biochimie C
FAURE-JOYEUX	Marie	Physiologie-Pharmacologie.
FOUCAUD-GAMEN	Jacqueline	Bactériologie-Virologie.
GEZE	Annabelle	Pharmacotechnie Galénique
GILLY	Catherine	Chimie Thérapeutique
GUIRAUD	Pascale	Biologie cellulaire
GROSSET	Catherine	Chimie analytique
HININGER-FAVIER	Isabelle	LBSO-Biochimie C
KRIVOBOK	Serge	Botanique-Cryptogamie
MORAND	Jean-Marc	Chimie thérapeutique
NICOLLE	Edwige	Chimie organique
PERA	Marie-Hélène	Chimie organique
PEYRIN	Eric	Chimie Analytique Alimentaire
PINEL	Claudine	Parasitologie
RAVEL	Anne	Chimie Analytique
RIBUOT	Diane	Physio. Pharmaco
RICHARD	Jean-Michel	Chimie Toxico-Ecotoxicologie
RIONDEL	Jacqueline	Physiologie Pharmacologie
TAILLANDIER	Georges	Chimie organique
VILLEMAIN	Danièle	Physique Pharmacie
VILLET	Annick	Chimie analytique



Serment des Apothicaïres

Je jure, en présence des maîtres de la faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.



REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à mon directeur de thèse, Madame Pinel Claudine, pour sa compréhension et sa patience. Je la remercie pour l'honneur qu'elle m'attribue en présidant ce jury de thèse.

Je suis gré à Madame Fricker-Hidalgo d'avoir accepté de juger ce travail.

Mes plus vifs remerciements vont à Sophie Morel, sans qui ce travail n'aurait pas pu être validé.

Une pensée particulière pour Danièle Bret (pour sa gentillesse) et Elise (pour son soutien).

Enfin, je dédie cette thèse à toute ma famille et plus particulièrement à « Yvette et Claude » qui m'ont supportée durant ces 3 années laborieuses.

PLAN

INTRODUCTION	1
LA TOXOPLASMOSE	2
I. L'AGENT PATHOGENE	2
1. Morphologie et caractéristiques	2
a. <u>Le tachyzoïte</u>	
b. <u>Les bradyzoïtes</u>	
c. <u>Les sporozoïtes</u>	
2. Cycle parasitaire	6
3. Contamination	8
II. LA MALADIE	9
1. Clinique	9
a. <u>La toxoplasmose acquise</u>	
b. <u>La toxoplasmose congénitale</u>	
❖ Premier stade	
❖ Deuxième stade	
❖ Troisième stade	
2. Epidémiologie	11
a. <u>Toxoplasmose humaine</u>	
b. <u>La toxoplasmose animale</u>	
III. LE TRAITEMENT	13
1. Mode d'action des médicaments disponibles	13
2. Protocoles thérapeutiques	14
a. <u>Toxoplasmose et immunodépression</u>	
❖ Traitement de la toxoplasmose	
❖ Chimio prophylaxie primaire de la toxoplasmose	
b. <u>Toxoplasmose acquise de la femme enceinte</u>	
c. <u>Toxoplasmose congénitale</u>	
3. Besoins de molécules nouvelles	16
4. Perspectives	16
IMMUNITE ANTI-TOXOPLASMIQUE	18
I. IMMUNITE CELLULAIRE	18
1. Les cellules impliquées dans l'immunité cellulaire	20
a. <u>Les lymphocytes T</u>	
❖ Rappels	
❖ Lymphocytes CD8+	
❖ Lymphocytes CD4+	
b. <u>Les macrophages</u>	
❖ Fonctions des macrophages	
❖ Le NO	
c. <u>Les polynucléaires neutrophiles (PNN)</u>	
❖ Implication des PNN	
❖ Fonctions des PNN	
d. <u>Les natural killer cells (NK)</u>	
❖ Cytotoxicité	
❖ Production d'IFN- γ indépendante des cellules T	

2. Les cytokines	33
a. <u>Interleukine 12 : IL-12</u>	
b. <u>IL-10</u>	
c. <u>Cytokines et immunodéficience</u>	
d. <u>IFN-γ : rôle pivot</u>	
❖ Expériences	
❖ Source d'IFN- γ	
❖ Action	
II. IMMUNITE HUMORALE	41
1. Réponse humorale	41
a. <u>Les IgM</u>	
b. <u>Les IgG</u>	
c. <u>Les IgA</u>	
d. <u>IgE</u>	
2. Rôle des anticorps	43
III. IMMUNITE LOCALE	44
1. Anatomie fonctionnelle du système immunitaire muqueux digestif	44
a. <u>La branche afférente</u>	
b. <u>La branche efférente</u>	
2. Rôle des muqueuses dans la toxoplasmose	46
3. Rôle des entérocytes	47
IV. CONCLUSION	48
LA VACCINATION	50
I. LES VACCINS	50
1. La vaccination par microorganismes tués	50
2. La vaccination par microorganismes vivants	51
a. <u>Utilisation de microorganismes vivants atténués</u>	
❖ But de l'atténuation	
❖ Avantages et inconvénients	
❖ Méthode d'atténuation	
b. <u>Utilisation de vecteurs vivants</u>	
3. Vaccination par antigènes protecteurs isolés	53
a. <u>Obtention d'antigènes par clonage</u>	
b. <u>Utilisation de peptides de synthèse</u>	
4. Vaccination ADN	54
a. <u>Les techniques de transfert de gènes</u>	
b. <u>La composition des vaccins ADN</u>	
c. <u>Mécanismes d'activation du système immunitaire par les vaccins ADN</u>	
❖ Induction de la réponse immune	
❖ Présentation antigénique	
❖ Maintenance des réponses	
❖ Séquences d'ADN immunostimulatrices	
d. <u>Avantages de l'injection d'ADN</u>	
e. <u>Problèmes de sécurité liés à l'injection d'ADN</u>	
❖ Intégration	
❖ Anticorps anti-ADN	
❖ Tolérance	

II. LES ADJUVANTS.....	64
1. Les adjuvants « classiques ».....	64
a. <u>Effet de dépôt</u>	
b. <u>Activation des macrophages</u>	
c. <u>Nouvelles techniques d'inoculation des antigènes</u>	
2. Les accessoires de la vaccination ADN.....	66
a. <u>Les cytokines</u>	
b. <u>Les molécules de costimulation</u>	
c. <u>Les molécules de ciblage</u>	
III. DIFFICULTES LORS DE LA MISE AU POINT DE VACCINS	66
1. La séquestration anatomique	67
2. La résistance aux mécanismes effecteurs.....	67
a. <u>Résistance au complément</u>	
b. <u>Résistance à la lyse intracellulaire</u>	
3. Echappement à la reconnaissance	67
4. La modification des antigènes de surface.....	68
5. Altération des défenses de l'hôte.....	69
a. <u>Immunosuppression chez la souris</u>	
❖ Implication des RNI	
❖ IL-10	
❖ IL-2	
❖ Intervention du calcium	
b. <u>Immunosuppression chez l'homme</u>	
c. <u>Activité superantigène</u>	
❖ Définition	
❖ Application à <i>T. gondii</i>	
IV. LES CANDIDATS VACCINS	75
1. Choix des composants.....	75
2. Cas des ESA.....	76
3. Cas de SAG1	77
a. <u>Description de P30</u>	
b. <u>Intérêt P30</u>	

***T.GONDII* ET APPROCHES VACCINALES..... 79**

I. MODELE MURIN	79
1. Objectifs de la vaccination.....	79
2. Vaccins vivants atténués	81
a. <u>Intérêts de la souche ts-4</u>	
b. <u>Résistance des souris immunocompétentes</u>	
c. <u>Chez l'hôte immunodéprimé</u>	
d. <u>Toxoplasmose congénitale</u>	
3. Vaccins à base de protéines.....	84
a. <u>Utilisation de SAG1</u>	
❖ SAG1 + liposome	
❖ SAG1 + adjuvant de Freund	
❖ SAG1r	
❖ SAG1r + IL-12	
❖ SAG1r + Quil A	
❖ SAG1r + alun	

b. <u>Utilisation de SAG2</u>	
❖ Les ISCOMs	
❖ Expérience antérieure	
❖ P22 et ISCOM	
c. <u>Utilisation des granules denses</u>	
❖ GRA2 et GRA5	
❖ GRA4	
4. Vaccins à base de peptides.....	94
a. <u>Peptides de SAG1</u>	
❖ Etudes préliminaires	
❖ Expériences et résultats	
b. <u>MAP</u>	
5. Immunisation par voie muqueuse	98
a. <u>Voie orale</u>	
❖ Approche vaccinale de première génération	
❖ Approche vaccinale de seconde génération, utilisation de vecteurs	
b. <u>Antigènes administrés par voie nasale</u>	
❖ SAG1+ TC	
❖ SAG1+Salbutamol	
6. Vecteurs vivants.....	105
a. <u>Utilisation de CPA</u>	
b. <u>BCG</u>	
7. Vaccins ADN.....	108
a. <u>Vaccins ADN et toxoplasmose</u>	
❖ Expérience de Nielsen HV et al-1999	
❖ Expérience d'Angus CW et al-2000	
❖ Potentiel protecteur des ESA (Desolme B et al-2000)	
❖ Expérience de Vercammen M et al-2000	
b. <u>Perspectives</u>	
c. <u>Conclusion</u>	
II. ANIMAUX D'ELEVAGE	111
1. La brebis.....	111
a. <u>Essais de vaccinations</u>	
b. <u>Toxovax</u>	
❖ Composition et mode d'emploi	
❖ Précautions d'emploi	
❖ Propriétés	
❖ Inconvénients	
❖ Efficacité de « Toxovax »	
❖ Immunité chez la brebis	
❖ Conclusion	
2. Le porc	117
a. <u>Utilisation de tachyzoïtes vivants de la souche RH</u>	
b. <u>Utilisation de ts-4</u>	
c. <u>Utilisation d'oocystes irradiés</u>	
III. LE CHAT.....	119
1. Expérience de Freyre A et al-1993.....	119
a. <u>Efficacité du vaccin</u>	
b. <u>Conclusion</u>	
IV. CONCLUSION.....	121
CONCLUSION GENERALE	123
REFERENCES.....	125

INTRODUCTION

La fin de ce millénaire est marqué par une inquiétante émergence de la plupart des maladies parasitaires.

En médecine humaine, les différents chiffres concernant l'épidémiologie de la toxoplasmose sont imprécis et reposent le plus souvent sur des extrapolations. Selon l'OMS, un tiers de la population mondiale posséderait des anticorps anti-toxoplasmiques. En France, une des zones les plus touchées, on estime que la séroprévalence peut atteindre 70 % (Nozais *et al*-1996).

Infection bénigne et même fréquemment asymptomatique sous sa forme acquise chez l'individu immunocompétent, elle peut entraîner des complications importantes susceptibles de menacer le pronostic vital lorsqu'elle survient chez le nouveau-né contaminé en cours de grossesse et surtout chez les sujets immunodéprimés.

Des innovations thérapeutiques sont très souhaitables car les principaux médicaments actifs datent de plusieurs décennies. La recherche de nouvelles molécules efficaces, en particulier contre les kystes, et surtout dépourvues de toxicité, constitue un axe innovant dans la lutte contre ce parasite.

En médecine vétérinaire, la toxoplasmose représente l'une des zoonoses les plus répandues. L'infection est généralement latente mais chez quelques espèces, notamment le mouton, elle peut être la cause de pertes économiques considérables.

Le développement d'un vaccin efficace contre cette affection présente donc un intérêt économique conséquent. L'observation qu'une primo-infection conduit à une immunité spécifique et durable contre la réinfestation explique les recherches intensives sur une méthode de vaccination qui permettra une protection performante.

Le modèle animal a fait l'objet d'un patient et fructueux investissement que nous aborderons après avoir traité les bases de l'immunologie anti-parasitaire et rappelé les caractéristiques du toxoplasme, de la maladie et des traitements médicamenteux.

LA TOXOPLASMOSE

I. L'AGENT PATHOGENE

Le toxoplasme est un protozoaire intracellulaire obligatoire de l'embranchement des Apicomplexa, de la classe des sporozoaires. *Toxoplasma gondii* représente au sein du phylum, le modèle le plus ubiquiste de par sa large palette d'hôtes intermédiaires (les homéothermes) qui lui assurent une distribution planétaire. Cette réussite dans l'adaptation parasitaire va de pair avec une très bonne tolérance par l'hôte. Pourtant, deux circonstances particulières rendent ce parasite redoutable :

- l'immaturité des défenses immunitaires du fœtus, à l'origine de la toxoplasmose congénitale,
- l'immunodépression qui crée ou recrée des conditions de prolifération pour le parasite.

1. Morphologie et caractéristiques

Le toxoplasme se présente sous trois formes :

- tachyzoïte (forme végétative proliférative) ou trophozoïte,
- bradyzoïte, contenu dans un kyste qui est une forme de résistance tissulaire,
- sporozoïte, contenu dans les oocystes, formes de résistance dans le milieu extérieur.

a. Le tachyzoïte

Le tachyzoïte est la forme présente au stade aigu de l'infection. C'est un organisme de 5 à 8 μm de long sur 2 à 5 μm de large, en forme de croissant, dont l'extrémité postérieure est arrondie et l'antérieure effilée. Le complexe apical est constitué d'un conoïde surmonté de deux anneaux polaires. A ce niveau, partent 22 fibrilles sous-pelliculaires qui parcourent longitudinalement presque toute la cellule. Des organelles en forme de massue, dénommées rhoptries, se terminent dans le conoïde. Elles sont au nombre de 8 à 10 et ont vraisemblablement comme origine l'appareil de Golgi. La partie antérieure du tachyzoïte renferme deux autres types de structures vésiculaires : les micronèmes en forme de bâtonnets et les granules denses de forme arrondie. Les fonctions du conoïde, des rhoptries et des

micronèmes ne sont pas entièrement connues. Les rhoptries ont une fonction sécrétoire, déversant leur contenu dans le conoïde. Celui-ci est associé à la pénétration cellulaire du toxoplasme à travers les membranes de la cellule-hôte.

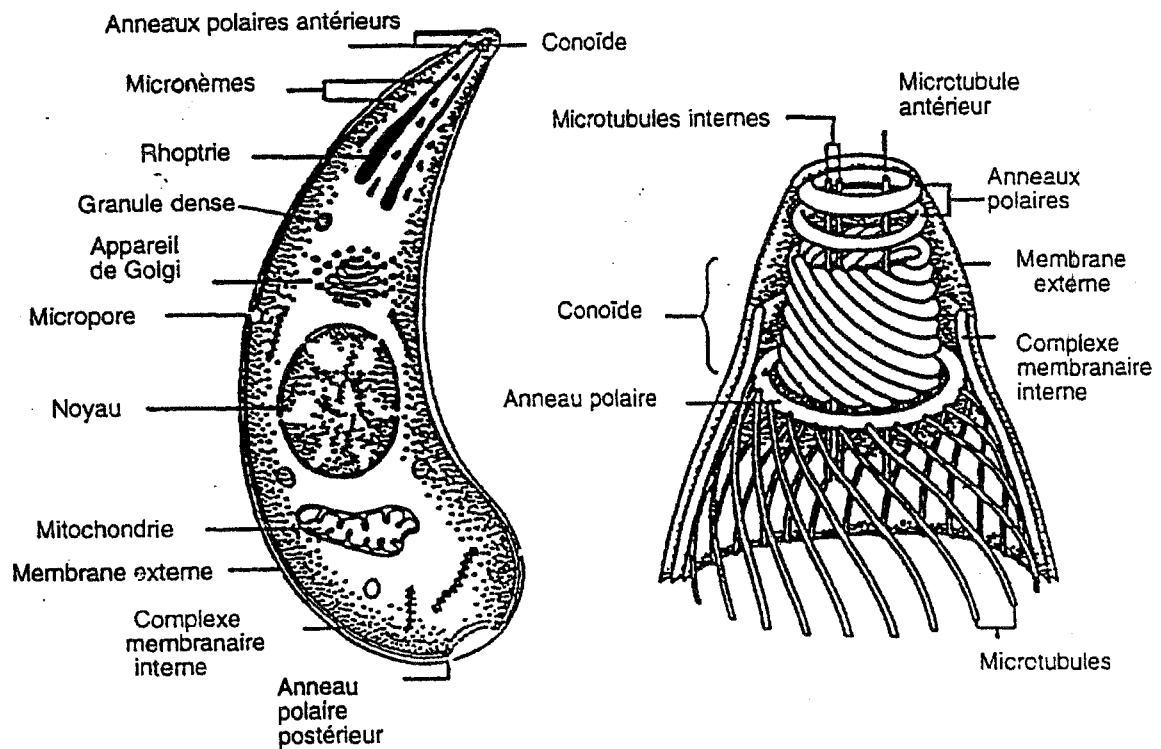


Figure 1 : Ultrastructure d'un tachyzoïte

Le tachyzoïte est rapidement détruit par l'acidité gastrique et n'entraîne donc pas de contamination par voie orale. Il est responsable de la contamination fœtale par voie transplacentaire et d'exceptionnelles contaminations de receveurs non immuns par des greffes de moelle ou des transfusions sanguines.

Cette forme peut se multiplier dans toutes les cellules du système réticulo-endothélial, au sein d'une vacuole parasitophore, par un processus de division cellulaire appelé endodyogénie. Les cellules hôtes contenant plusieurs tachyzoïtes se désintègrent et libèrent les parasites qui vont envahir les cellules adjacentes. Ils échappent à l'action des processus de digestion cellulaire, ce qui permet leur transformation en bradyzoïtes. La transformation est favorisée par l'établissement de l'immunité anti-toxoplasmique mais celle-ci n'est pas le seul facteur puisque qu'elle se produit en culture cellulaire, en l'absence de facteurs immuns connus.

b. Les bradyzoïtes

Ils se développent beaucoup plus lentement que les tachyzoïtes, dans une structure particulière : le kyste.

Les kystes mesurent de 15 à 100 μm de long, sont entourés d'une épaisse membrane parasitaire et peuvent être observés dans tous les tissus, particulièrement les tissus très irrigués comme le cerveau, les yeux et les muscles. Ils sont très résistants, ne sont pas affectés par des températures inférieures à 45°C ni par l'acidité gastrique, mais sont détruits par la congélation à -20°C. De ce fait, ces structures assurent un des modes de contamination de l'homme par ingestion de viande contaminée consommée insuffisamment cuite.

D'une pathogénicité réduite, les bradyzoïtes constituent donc la forme observée chez les individus chroniquement infectés. Les kystes présents dans les tissus vont survivre plusieurs mois, voire plusieurs années, peut-être même durant toute la vie, assurant ainsi une stimulation permanente du système immunitaire, responsable de la prémunition contre toute nouvelle infestation.

Chez l'immunodéprimé, il y a réactivation des kystes quiescents et transformation des bradyzoïtes en tachyzoïtes qui se multiplient, disséminent localement dans l'organe imputé ou gagnent par voie hématogène l'ensemble de l'organisme.

Le mécanisme de la réactivation n'est pas encore connu. Il est possible que les kystes générés aient une durée de persistance limitée, finissent par s'ouvrir et libérer les bradyzoïtes infectieux qu'ils contiennent.

Dans ce cas, si l'individu est toujours immunocompétent, les parasites sont rapidement décelés par les défenses de l'hôte, qui les neutralisent ou les conduisent aussitôt à se réenkyster, sans phase proliférative patente.

Au contraire, à partir du moment où l'immunodépression est assez avancée, l'hôte ne peut plus juguler le développement parasitaire et l'envahissement progressif du tissu. La destruction des cellules conduit à des lésions irréversibles, généralement fatales sans traitement.

L'éclatement des kystes est favorisé par de multiples facteurs : défenses immunitaires, état d'immunodépression, sensibilité individuelle, virulence de la souche parasitaire sont les principaux éléments à prendre en compte.

c. Les sporozoïtes

L'oocyste est la forme de résistance dans le milieu extérieur. Lorsqu'il est éliminé avec les fèces des chats, sa forme est presque sphérique et ne contient qu'une masse granuleuse. Il est à ce stade immature et non infectieux. Après sporulation dans le milieu extérieur, deux sporoblastes se différencient par division. Ils s'allongent et forment deux sporocystes ovoïdes (6 à 8 μm) à l'intérieur desquels se différencient 4 sporozoïtes. Ce processus demande habituellement 1 à 5 jours. Si la température est de 25°C et le milieu humide, conditions les plus favorables, ils sporulent en 24 à 48 h. Quand la température baisse, la sporulation est plus lente : 5 jours à 15°C, elle ne se produit pas à 4°C. Une température élevée (37°C) est défavorable.

Un seul et même chat répand dans son environnement des centaines de milliers, voire des millions d'oocystes. La durée d'excrétion est de 1 à 3 semaines. Les oocystes sont résistants et peuvent être retrouvés dans le sol humide jusqu'à un an après leur émission par le chat qui enterre lui-même ses excréments. Les chats affectionnant les habitations humaines, on trouvera leurs excréments dans la terre des jardins ou dans les tas de sable aménagés pour les jeux des enfants. Ainsi les probabilités de se contaminer avec des oocystes de toxoplasme sont très élevées à proximité des lieux d'habitation.

L'oocyste, non affecté par l'acidité gastrique, est responsable de la contamination des herbivores et de l'homme par voie orale.

2. Cycle parasitaire

Le cycle de développement de *T. gondii* comprend deux phases :

- une phase endogène selon un mode coccidien monoxène classique, dans la muqueuse intestinale du chat ou d'autres félidés. Dans ce cas, plusieurs générations schizogoniques, issues de la multiplication asexuée, précèdent la formation de gamètes qui donnent naissance à l'oocyste, assurant la transmission vers un autre félidé ou vers les hôtes intermédiaires.

Curieusement, il a été récemment montré que ce cycle sexué est très peu efficace : les oocystes sont très peu infectieux pour le chat, et il semble même que les sporozoïtes issus de l'oocyste ne donnent pas lieu directement au cycle entérique, mais que des stades plus profonds, identiques à ceux rencontrés chez les hôtes intermédiaires, soient un passage obligé avant la phase coccidienne typique.

- une phase de multiplication asexuée qui a lieu chez l'homme et chez tous les homéothermes carnivores, omnivores et herbivores.

Les sporozoïtes libérés après ingestion d'oocystes infestants ou les bradyzoïtes issus de kystes tissulaires pénètrent dans les cellules de la muqueuse intestinale, se transforment en tachyzoïtes, s'y multiplient et entraînent la lyse des cellules parasitées. La multiplication des tachyzoïtes au niveau des cellules du système histiomonocytaire assure une diffusion à l'ensemble de l'organisme : l'infection se propage dans de nombreux organes, bien que les cellules affectées, hors les phagocytes de la lignée monocytaire, soient mal connues.

Au bout de quelques jours, avec l'apparition d'anticorps circulants et la mise en place de l'immunité cellulaire, les parasites libres se raréfient car ils sont lysés dès l'éclatement de la cellule infectée. Les défenses immunitaires efficaces limitent donc la progression parasitaire et la cantonne aux tissus nerveux, musculaire et à la rétine, où les processus immunitaires sont beaucoup plus lents à s'établir. Il y a alors passage de la forme tachyzoïte à la forme bradyzoïte, enkystement dans les cellules pérennes et on aboutit à une phase chronique de quiescence.

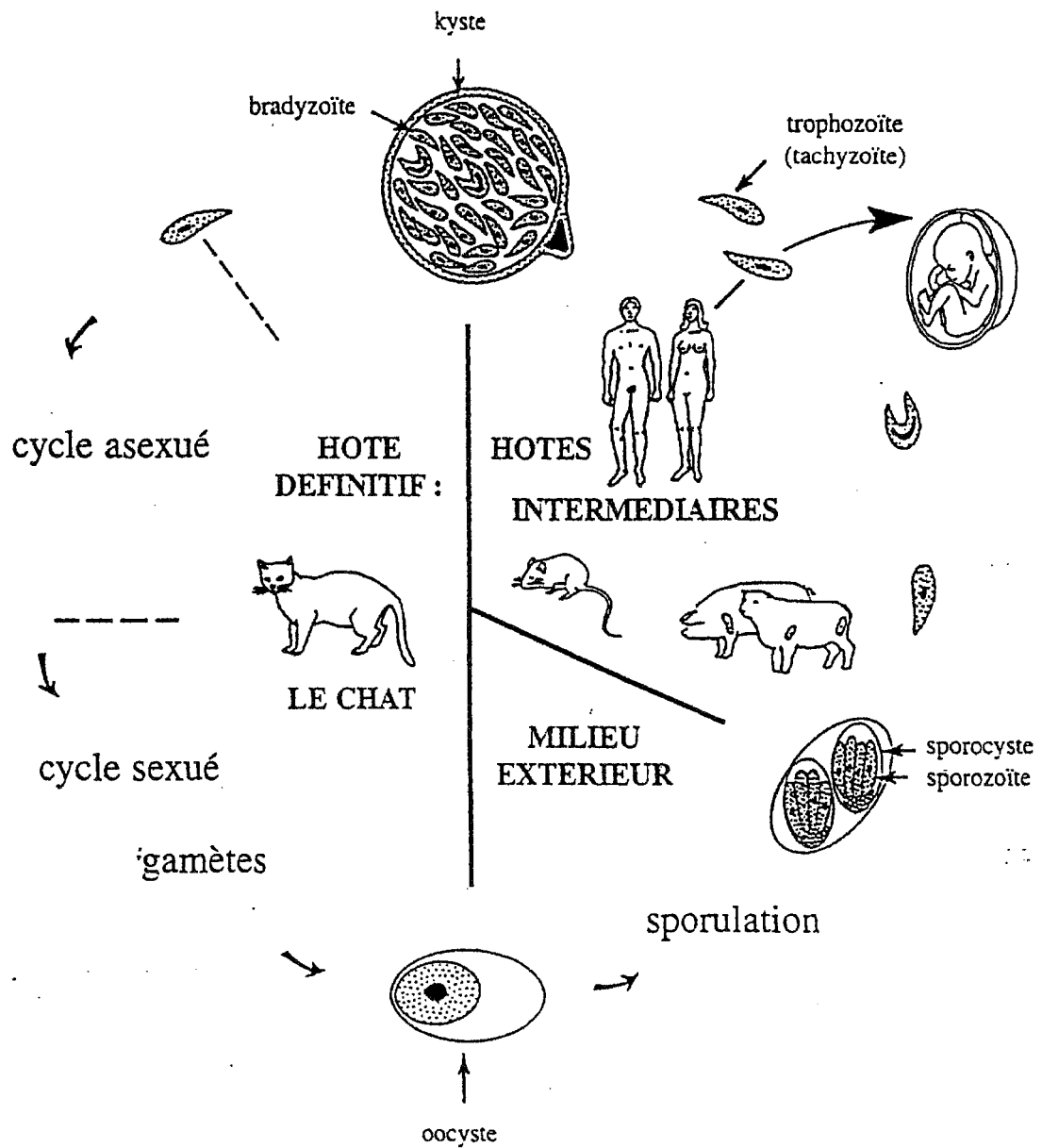


Figure 2 : Cycle de *T. gondii*

3. Contamination

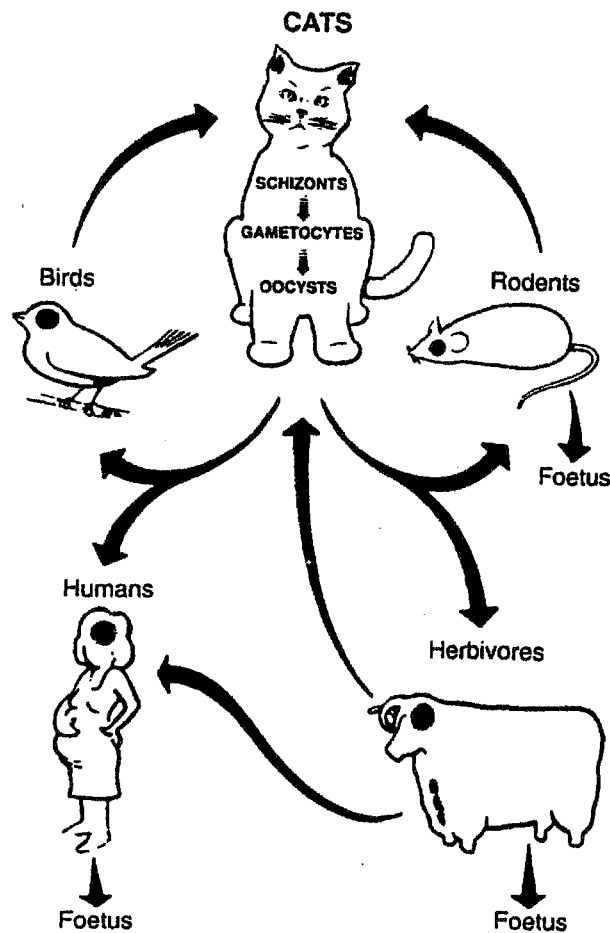


Figure 3 : Modes de contamination

La contamination humaine reconnaît trois possibilités :

- ingestion d'oocystes sporulés,
- ingestion de kystes contenus dans les aliments (viande mal cuite, mouton en particulier mais également porc) : c'est le mode de contamination principal et les habitudes alimentaires différentes expliquent la diversité des prévalences de la parasitose selon les pays.
- passage de tachyzoïtes de la mère au fœtus, par voie sanguine à travers le placenta : c'est la transmission congénitale.

II. LA MALADIE

1. Clinique

a. La toxoplasmose acquise

- Elle est habituellement cliniquement inapparente.
- Ses manifestations sont le plus souvent bénignes : on peut observer une discrète élévation thermique, une asthénie, une polyadénopathie essentiellement cervicale, des modifications de la formule leucocytaire (syndrome mononucléosique sans hyperleucocytose) et parfois un syndrome infectieux. Bien que des atteintes ganglionnaires et des asthénies persistantes aient été rapportées, ces symptômes disparaissent en général spontanément.
- Les formes graves sont observées chez les sujets immunodéprimés : immunodépression acquise (S.I.D.A.), thérapeutique (immunosuppresseurs ou corticoïdes) ou chez des sujets atteints d'hémopathies malignes (maladie de Hodgkin, lymphomes).

Elles correspondent fréquemment à des réactivations toxoplasmiques chez des sujets immunisés. Elles sont observées chez 15 à 37% des malades atteints par le VIH. La principale localisation est une encéphalite. Les autres localisations, plus rares, sont une chorioretinite, une pneumopathie ou une toxoplasmose disséminée. En l'absence de traitement, l'issue est fatale.

b. La toxoplasmose congénitale

L'infection fœtale résulte du passage du toxoplasme sous la forme tachyzoïte de la mère au fœtus par voie sanguine à travers le placenta. Elle peut provoquer une interruption spontanée de la grossesse ; la maladie chez l'enfant peut être latente, grave ou atténuée. L'éventualité la plus fréquente correspond aux formes pauci-symptomatiques ou mêmes strictement inapparentes à la naissance qui entraînent d'éventuelles complications qu'après des délais parfois très longs.

La fréquence et la gravité de l'atteinte dépendent de plusieurs facteurs : le passage transplacentaire du parasite, la virulence de la souche, l'importance de la parasitémie maternelle. Le toxoplasme se localise dans le placenta et ne peut franchir cette barrière qu'à la

faveur d'une lésion, ceci difficilement en début de grossesse, beaucoup plus facilement en fin. La résistance du fœtus à l'infection et son aptitude à synthétiser des anticorps, la thérapeutique instituée plus ou moins rapidement interviennent également. En fait, le facteur essentiel reste la date de contamination maternelle. Les différentes enquêtes montrent que la fréquence de transmission est d'autant plus grande que la grossesse est plus avancée au moment de la contamination maternelle. Inversement, l'atteinte fœtale est d'autant plus sévère que la contamination maternelle est précoce. Il est donc admis que la période la plus dangereuse se situe entre la 10^{ème} et la 24^{ème} semaine où fréquence et gravité se conjuguent.

La toxoplasmose congénitale est une maladie d'un grand polymorphisme et d'une gravité extrêmement variable. Il est classique de décrire trois stades :

❖ Premier stade

Si l'infection est tardive, survenant dans le dernier trimestre de la grossesse, le nouveau-né présente à la naissance une toxoplasmose à la phase primaire. A ce stade, les formes inapparentes sont les plus fréquentes. S'il y a une traduction clinique, on peut observer un ictère néonatal accompagné d'hépatomégalie et même de splénomégalie. Des lésions cardiaques et une atteinte oculaire peuvent être associées.

❖ Deuxième stade

Si la mère a été contaminée au cours du 2^{ème} trimestre de la grossesse, le tableau à la naissance est celui d'une encéphalite évolutive. La toxoplasmose congénitale est à la phase secondaire. Les signes cliniques sont neurologiques. Si l'évolution n'est pas fatale, l'enfant est exposé à des lésions nerveuses irréductibles.

❖ Troisième stade

Lorsque la mère a été contaminée pendant les premiers mois de la gestation, la totalité de la maladie s'est développée *in utero*. Des formes graves sont observées.

Le tableau d'infection sévère avec atteinte multiviscérale, syndrome hémorragique, ictère, hépatosplénomégalie, encéphalopathie conduit à un décès rapide.

Les séquelles sont parfois considérables et réalisent le tableau clinique classique de la toxoplasmose congénitale neuro-oculaire. Elle se caractérise par 4 groupes de signes :

- aspect et volume du crâne (hydro ou microcéphalie),
- manifestations neurologiques (crises convulsives, retard psychomoteur, troubles du tonus à type d'hypotonie généralisée ou au contraire localisée à la nuque, paralysies sous forme de monoplégie, d'hémiplégie ou de paraplégie),
- calcifications cérébrales le plus souvent multiples,
- lésions oculaires avec microphthalmie, strabisme, secousses nystagmiformes. Les signes principaux sont en fait retrouvés à l'examen du fond d'œil. Ils sont représentés par une chorioretinite pigmentaire.

2. Epidémiologie

a. Toxoplasmose humaine (Nozais JP *et al*-1996)

- On estime à 500 millions le nombre d'individus porteurs du parasite de par le monde. Cependant, les études de séroprévalence montrent des variations importantes entre pays (0.7% en Chine, 70% en France, 10-30% aux Etats-Unis) et même, à l'intérieur d'un pays. Ces variations s'expliquent par des différences d'habitudes culinaires, par les conditions climatiques, le niveau d'hygiène de la population et l'abondance des chats. Un environnement chaud et humide étant propice à la survie des oocystes, la prévalence est importante dans les pays tropicaux où existent une grande concentration de félins (80% au sud du Brésil).

- La neurotoxoplasmose représente la 3^{ème} cause d'infection opportuniste et la 1^{ère} cause de lésion intracérébrale chez les patients immunodéprimés. C'est la manifestation inaugurale de 20% des SIDA. Cependant, en France, depuis l'introduction des multiples thérapies antirétrovirales, on observe une baisse importante de morbidité associée à l'infection par le HIV. Entre les deux premiers semestres de 1996 et 1997, l'incidence de la toxoplasmose cérébrale a diminué de 65% parmi la population infectée par le HIV suivie à l'hôpital (*Rev Prescr*-1999).

- La fréquence des toxoplasmoses congénitales est estimée aux environs de 1 à 2 cas pour 1000 naissances. Lors d'une primo-infection toxoplasmique chez la mère en cours de

grossesse, la maladie n'est pas transmise systématiquement au fœtus. Selon les travaux de Desmonts G et Couvreur J-1984, 34% seulement des fœtus sont atteints. De plus, en cas de contamination, ce sont les formes monosymptomatiques et inapparentes qui sont les plus fréquentes. Dans leur étude prospective portant sur 210 cas de toxoplasmose congénitale, Desmonts G et Couvreur J ont pu classer les malades en quatre catégories :

- formes mortelles (0,9 % des cas),
- formes graves (10 % des cas),
- formes bénignes se traduisant soit par une chorioretinite périphérique, soit par des calcifications cérébrales isolées sans signe clinique d'atteinte nerveuse (34 % des cas),
- formes latentes (55% des cas). Ces formes sont susceptibles d'évoluer secondairement des mois ou des années après la naissance, avec un risque accru en période pubertaire. Les manifestations oculaires du type chorioretinite peuvent survenir sur une rétine antérieurement saine ; leur siège maculaire est un facteur de diminution de l'acuité visuelle.

b. La toxoplasmose animale

La toxoplasmose est cosmopolite et représente l'une des zoonoses les plus répandues. Les examens sérologiques effectués chez des moutons, des chèvres, des chevaux et des bovins ont confirmé la très grande incidence de l'infection chez ces animaux. Sa prévalence varie selon l'aire géographique considérée et la méthode sérologique utilisée. La détection du parasite dans la viande des animaux présente un intérêt tout particulier pour la santé publique, puisque la viande insuffisamment cuite est l'une des principales sources de l'infection chez l'homme. En Europe, la fréquence du parasitisme peut dépasser 50% dans la viande de mouton. En règle générale, les bovins s'infestent moins facilement que les autres espèces et les kystes musculaires sont moins fréquents et ne sont viables que pendant une période plus courte.

Chez les animaux, la maladie est semblable à celle de l'homme. L'infestation est généralement latente mais chez quelques espèces, notamment le mouton, elle peut être la cause de pertes économiques considérables. Comme chez l'homme, la toxoplasmose congénitale des agneaux survient lorsque la brebis est infectée durant la gestation. Lorsque l'infestation se situe entre 45 et 55 jours après le début de la gestation, généralement le fœtus meurt. Lorsque l'infestation intervient pendant le 3^{ème} mois de gestation, l'agneau naît vivant mais malade. Quand l'infestation est contractée pendant le 4^{ème} mois, l'agneau peut naître infesté mais apparemment sain.

III. LE TRAITEMENT

C'est dans ce domaine que le retard le plus important a été accumulé. Les principaux médicaments datent de plusieurs décennies et peu de nouveaux produits sont actuellement à l'étude.

1. Mode d'action des médicaments disponibles (Derouin F *et al*-1993)

- Les voies métaboliques chez *T. gondii* sont assez mal connues, mais certaines d'entre elles sont communes à plusieurs protozoaires. C'est le cas notamment de la voie de synthèse des folates faisant intervenir la dihydrofolate synthétase et la dihydrofolate réductase (DHFR). Ces enzymes sont respectivement inhibées par les sulfamides et les inhibiteurs de la DHFR dont le chef de file est la pyriméthamine, d'où un blocage de la synthèse d'acide folique chez le parasite. Celui-ci ne pouvant intégrer l'acide folique exogène, il en résulte une carence en folates responsable secondairement d'altérations de la synthèse des bases puriques et des troubles de division cellulaire.

L'activité synergique de l'association sulfamide-inhibiteur de la DHFR est démontrée *in vivo* et *in vitro*. L'association pyriméthamine (Malocide®) à la dose de 1 à 2 mg/kg/jour et de sulfadiazine (Adiazine®) à la dose de 0,05 à 0,10 g/kg/jour est la thérapeutique la plus active contre la toxoplasmose. La pyriméthamine est également prescrite avec un sulfamide retard, la sulfadoxine (Fansidar®).

- La synthèse des protéines peut être partiellement inhibée par les macrolides ou les cyclines. Ces deux familles médicamenteuses ont un mécanisme d'action parfaitement bien défini sur les bactéries, en agissant sur l'assemblage peptidique au niveau ribosomal. Ce mode d'action n'est pas démontré chez les protozoaires : les structures ribosomales sont différentes de celles des bactéries et aucune étude n'a prouvé la fixation de ces médicaments sur les ribosomes parasitaires. Parmi les cyclines, la minocycline est la plus active. On observe en particulier un bon résultat sur le parasitisme cérébral, probablement en rapport avec la liposolubilité de la molécule. Un effet synergique important est observé lorsque minocycline et clarithromycine sont associées. Cette association présente l'avantage majeur de représenter une alternative à l'utilisation des inhibiteurs de la synthèse des folates.

- L'Atovaquone est un inhibiteur spécifique du transport d'électrons de la chaîne respiratoire du parasite. La particularité de ce médicament est d'être actif *in vitro* sur les kystes. *In vivo*, l'atovaquone est efficace, en terme de survie des animaux traités, lorsqu'elle est administrée à forte dose mais elle ne permet pas l'éradication des parasites tissulaires et des rechutes sont constamment observées.

- La dapsons est un antilépreux de la famille des sulfones, ayant également une action sur *T. gondii*.

2. Protocoles thérapeutiques

a. Toxoplasmose et immunodépression

❖ Traitement de la toxoplasmose (Raynaud JM *et al*-1993)

La thérapeutique de référence de la toxoplasmose au cours du sida associe :

- pyriméthamine 50-75 mg/j,
- sulfadiazine 6-8 g/j,
- acide folinique.

Dans certains cas, on remplace la sulfadiazine par de la clindamycine, antibiotique de la famille des macrolides, en intraveineuse, à raison de 2.4 à 4.8 g/jour.

Au décours du traitement d'attaque, une rémission complète ou partielle des symptômes n'est obtenue que chez $\frac{3}{4}$ des patients.

La survenue d'effets indésirables amène à interrompre l'un ou les deux médicaments dans 20 à 30% des cas (Carmickael C *et al*-1997).

Le traitement d'attaque, poursuivi au moins 3 semaines, doit être relayé par un traitement d'entretien maintenu à vie pour éviter les rechutes. Ce traitement d'entretien se base sur les mêmes molécules mais à des posologies moindres : 50 mg/jour de pyriméthamine associée à 2-3 g/jour de sulfadiazine.

La mortalité reste néanmoins très élevée : l'espérance de survie à un an n'est que de 29.9% après un premier épisode de toxoplasmose.

❖ Chimio prophylaxie primaire de la toxoplasmose

Une chimio prophylaxie primaire de la toxoplasmose doit être débutée si le patient possède une sérologie positive à *T. gondii* et s'il présente, soit un taux de lymphocytes T CD4+ inférieur à 100/mm³, soit une fièvre inexpliquée ou un muguet (Hirschel B *et al*-1998 ; Sackoff J *et al*-1998). Le but de cette stratégie est d'assurer au patient une protection constante, bien tolérée, efficace et cela tout au long de sa vie.

Aux doses réputées efficaces, le cotrimoxazole et l'association dapsone-pyriméthamine sont les deux prophylaxies primaires combinées validées. Le cotrimoxazole est le plus utilisé car il associe simplicité de prescription, bonne connaissance par le praticien, efficacité sur d'autres pathogènes, notamment sur *Pneumocystis carinii*, et absence d'interaction avec la didanosine.

Grâce à la prophylaxie primaire, la prévalence de la toxoplasmose est passée de 19% en 1988 à 6% en 1994 (Katlama C-1995). Dans une étude prospective rigoureuse, les patients ayant reçu des traitements préventifs présentent une incidence de toxoplasmose trois fois moindre que les autres. Malheureusement, après un an d'utilisation, au moins 25 % des patients auront abandonné leur thérapeutique, principalement à cause d'effets secondaires cutanés, digestifs ou hématologiques.

b. Toxoplasmose acquise de la femme enceinte

Le traitement est entrepris chez toute femme suspecte de toxoplasmose évolutive durant la grossesse pour éviter un passage transplacentaire et éventuellement une contamination du fœtus.

Il comporte l'administration de spiramycine à la dose de 3 g/jour, sans interruption et cela jusqu'à la fin de la grossesse. Ce produit se concentre dans le placenta : il diminue le risque de transmission maternofoetale du toxoplasme en réduisant la sévérité et la durée de la placentite toxoplasmique.

L'administration de pyriméthamine et de sulfamide n'est indiquée qu'en cas de contamination foetale prouvée par le diagnostic anténatal ou au cours du troisième trimestre de la grossesse.

c. Toxoplasmose congénitale

Les enfants nés de femmes ayant présenté une séroconversion toxoplasmique durant leur grossesse ont un suivi clinique, sérologique, radiologique et ophtalmique.

Quel que soit l'aspect de la maladie, la toxoplasmose congénitale prouvée impose un traitement systématique d'un an, même si l'infection reste infraclinique.

Il existe différents protocoles de traitement. Celui préconisé par Couvreur J *et al*-1984 associe : pyriméthamine : 0,5 à 1 mg/kg/jour, per os tous les 2, 3 ou 4 jours, sulfadiazine : 50 à 100 mg/kg/jour, per os tous les jours en 2 prises (matin et soir), acide folinique : 5 mg par voie intra-musculaire tous les 2, 3 ou 4 jours pendant le traitement avec la pyriméthamine. Ces 3 médicaments sont prescrits par cure de 21 jours et 2 à 4 cures sont prescrites pendant la 1^{ère} année de traitement.

Entre ces cures, l'enfant reçoit de la spiramycine : 100 mg/kg/jour, per os en 2 prises quotidiennes par cures de 30 à 45 jours.

3. Besoins de molécules nouvelles

Il reste à trouver une alternative pour les individus intolérants aux traitements existants, ce qui concerne environ 10 à 20% des cas. La substance active devra être non toxique, non tératogène, à diffusion tissulaire importante, y compris oculaire et cérébrale.

Il est évident que la meilleure solution thérapeutique lors de l'immunodépression serait d'être capable d'éradiquer tous les kystes présents chez le patient, de manière à éviter toute prolifération. Malgré l'existence de drogues assez efficaces envers la phase aiguë, il est actuellement impossible de réaliser cette éradication, les parasites enkystés étant réfractaires à l'action des drogues connues. Par ailleurs, les études expérimentales de réactivation chez la souris montrent que, malgré l'immunodépression, une partie au moins des parasites issus de kystes redéveloppent des bradyzoïtes. Le fait que le métabolisme des bradyzoïtes soit beaucoup plus lent que celui des tachyzoïtes limite indirectement l'effet de médicaments actifs sur le métabolisme et la division cellulaire. Cela justifie les efforts actuels visant à élucider de nouveaux métabolismes susceptibles de devenir des cibles thérapeutiques plus efficaces.

4. Perspectives

- Une découverte récente a enrichi considérablement les perspectives de lutte contre le parasite : il s'agit, en plus des génomes nucléaire et mitochondrial, de la présence d'un troisième génome, représenté par un ADN circulaire de quelques dizaines de kilobases. Il a été démontré que ce génome était contenu dans un organite plurimembranaire, l'apicoplaste, connu depuis plusieurs dizaines d'années en ultrastructure et dont la signification était jusque là énigmatique. Les comparaisons de séquences ont rapidement permis de trouver l'homologue le plus proche de cet ADN dans les chloroplastes de chlorophycées, et de conclure que cet organite conservé universellement chez tous les Apicomplexa devait dériver d'une endosymbiose avec une telle algue, intervenue alors que les ancêtres du phylum menaient encore une vie libre (Kohler S *et al*-1997). L'implication de cette découverte est évidente et illustrée de manière spectaculaire par la démonstration de la sensibilité des parasites aux herbicides. Ces métabolismes d'origine végétale sont en effet des cibles thérapeutiques de choix en vue de l'élimination de l'agent pathogène dans un hôte vertébré.

- Les progrès réalisés dans la connaissance des gènes exprimés par les deux stades parasitaires ont commencé à mettre en évidence que des allèles différents de gènes codant pour certaines enzymes (en particulier celles liées à la glycolyse ou au métabolisme énergétique) étaient exprimés selon les stades. Il semble ainsi que des différences métaboliques existent, qui pourraient devenir la cible d'intervention thérapeutique spécifique sur les kystes parasitaires, ou tout au moins, permettraient de connaître les éléments influant sur la biologie du parasite. Une connaissance de cette physiologie assurerait une meilleure appréhension de la physiopathogénie de la parasitose.

IMMUNITE ANTI-TOXOPLASMIQUE

Tous les types de réponse immunitaire sont sollicités lors de l'infection toxoplasmique. On oppose en général les moyens de défense immunitaire non spécifiques (certaines molécules circulantes ou sécrétées et cellules phagocytaires) aux moyens de défense immunitaire spécifiques (lymphocytes capables d'une reconnaissance élective des antigènes définissant les agents infectieux comme étrangers à l'organisme). Selon le stade de développement du parasite, certains mécanismes vont être privilégiés afin de rendre la défense infectieuse la plus efficace possible.

L'utilisation du modèle murin a largement aidé à l'analyse de ces mécanismes de défense anti-toxoplasmique. Compte tenu de l'étendue des connaissances disponibles à l'heure actuelle, il n'est pas possible de traiter ce sujet de manière exhaustive sans traiter l'immunologie dans son ensemble. Conserver la séparation entre immunité humorale, cellulaire et locale est indispensable mais il faut garder à l'esprit que tous les mécanismes sont liés.

I. IMMUNITE CELLULAIRE

La réponse immune à médiation cellulaire est le facteur majeur de résistance dans la lutte contre l'infection toxoplasmique.

Elle joue un rôle important dans l'élimination des formes tachyzoïtes et dans la prévention de la réactivation kystique :

- en 1985, Frenkel montre qu'un traitement par des corticoïdes modulant l'immunité cellulaire chez des hamsters chroniquement infectés par *T. gondii* induit la réapparition des kystes.
- l'infection par la souche ME49 qui est curable chez la souris normale, entraîne une dissémination parasitaire mortelle chez des souris dépourvues en cellules T (Hunter CA *et al*-1994).

La défense immunitaire met en jeu divers types de cellules comme les macrophages, les lymphocytes T, les cellules tueuses naturelles ainsi que des cytokines de type 1.

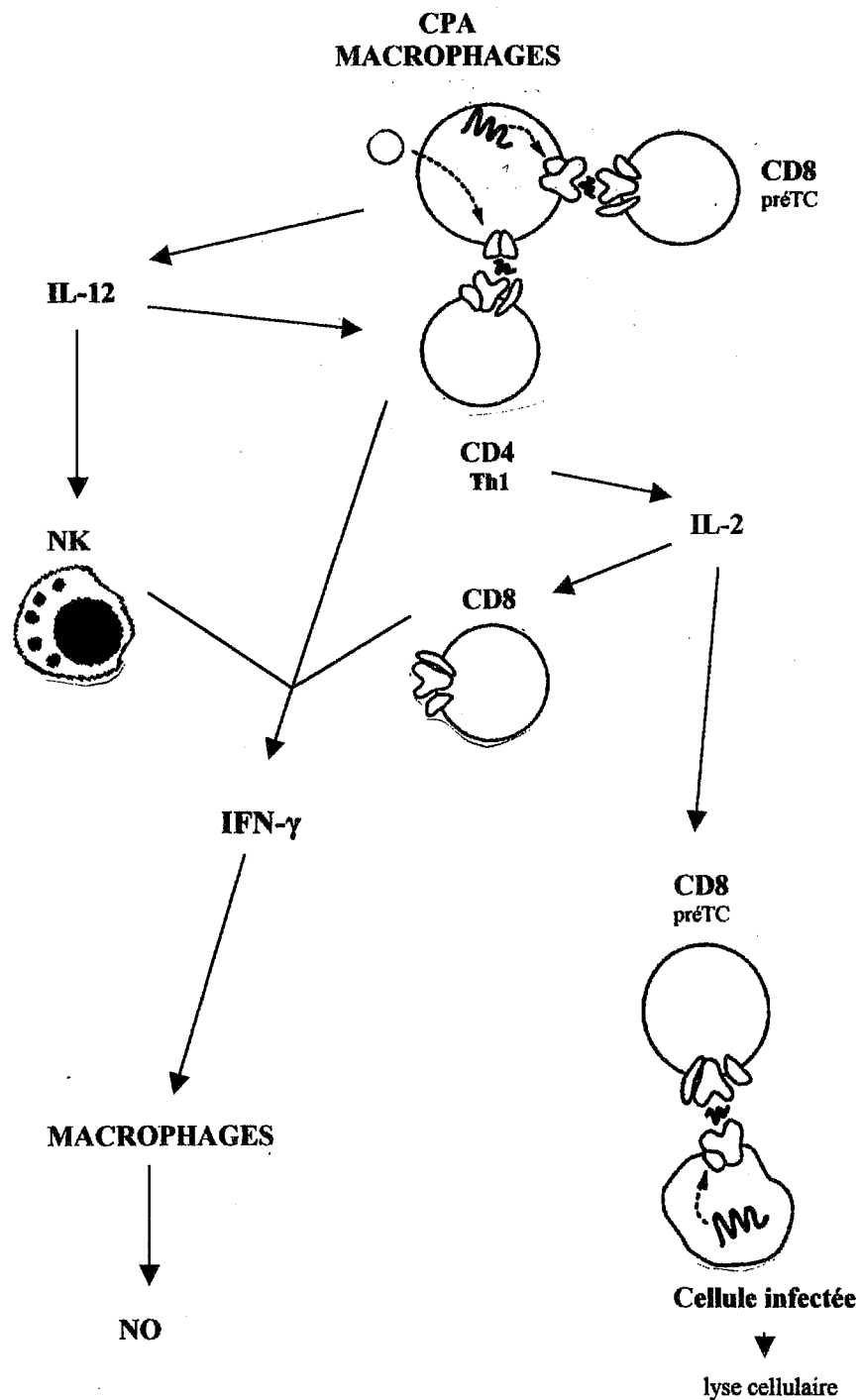


Figure 4 : Schéma simplifié de l'immunité anti-toxoplasmique

1. Les cellules impliquées dans l'immunité cellulaire

a. Les lymphocytes T

Le rôle essentiel des cellules T dans la protection contre *T. gondii* a été décrit pour la première fois par Frenkel en 1967. Ses travaux indiquent que le transfert de cellules lymphoïdes de hamsters infectées protège des animaux sains contre une dose létale de la souche virulente RH.

❖ **Rappels**

Les lymphocytes T se différencient en deux étapes :

- la phase centrale de différenciation se déroulant dans le thymus, conduit aux lymphocytes matures.
- la phase périphérique a lieu dans les organes lymphoïdes secondaires et permet l'adaptation du système immunitaire aux stimulations de l'environnement. Cette phase dépend d'un signal activateur induit par l'interaction du récepteur des cellules T (TCR) avec un peptide associé à une molécule de CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité). Les lymphocytes activés se différencient en lymphocytes effecteurs, cytotoxiques ou sécréteurs de cytokines, et en lymphocytes T à mémoire. L'activation induit également une expansion clonale par prolifération des lymphocytes T exprimant une même espèce moléculaire TCR.

Les cellules T se répartissent en deux populations majeures qui diffèrent par la classe des molécules CMH qu'elles reconnaissent et par leurs fonctions effectrices. Elles se distinguent l'une de l'autre par leurs protéines CD4 et CD8 qui sont associées à des composants du récepteur de la cellule T et sont appelées co-récepteurs : les CD4⁺ se lient à des parties invariantes des molécules du CMH de classe II et les CD8⁺ interagissent avec toutes les cellules exprimant des molécules de classe I du CMH.

Il apparaît logique que les cellules T reconnaissent surtout des antigènes associés aux molécules de classe I puisque celles-ci sont exprimées sur la plupart des cellules nucléées.

❖ Lymphocytes CD8+

Les lymphocytes T CD8+ sont les médiateurs majeurs de résistance à l'infection toxoplasmique (Parker SJ *et al*-1991). L'implication de cette population cellulaire a été faite *in vivo* par des expériences de déplétion sélective utilisant des anticorps monoclonaux et par des études de transfert de cellules spléniques : elle contrôle la formation de kystes et prévient leur réactivation (Khan IA *et al*-1994-1999 ; Brown CR *et al*-1990).

L'activité protectrice des CD8+ est liée à deux mécanismes :

- la production d'interféron- γ (IFN- γ)

Les cellules T spécifiques de *T. gondii*, prélevées 5 jours après l'infection, synthétisent de l'IFN- γ lorsqu'elles sont incubées en présence d'antigènes solubles de toxoplasme (STAg) et de macrophages. Même si les cellules sécrétrices sont principalement des CD4+ TCR- $\alpha\beta$ +, les CD8+ TCR- $\alpha\beta$ + contribuent de manière significative à la production d'IFN- γ (Gazzinelli RT *et al*-1991 ; Shirahata T *et al*-1994).

- l'activité cytolytique

Les CD8+ possèdent une activité cytolytique contre les cellules infectées (Subauste CS *et al*-1991) et les tachyzoïtes libres (Khan IA *et al*-1991). L'activité cytolytique envers les macrophages infectés est spécifique de l'antigène, restreinte par le CMH I et nécessite un contact direct entre effecteurs et cellules cibles (Hakim FT *et al*-1991).

Cette activité serait inefficace durant l'infection aiguë : la multiplication active des tachyzoïtes qui se répandent dans tout l'organisme les rendent difficilement contrôlables (Yamashita K *et al*-1998).

Les rapports de Denkers EY *et al*-1998 et 1999, montrent que les tachyzoïtes présents à l'intérieur de cellules cibles ne sont pas détruits par les lymphocytes T cytotoxiques (CTL) : les CD8+ lysent les cellules cibles, ce qui entraîne une libération de tachyzoïtes libres qui sont ensuite détruits soit par les macrophages activés par l'IFN- γ soit par les astrocytes et les cellules microgliales du système nerveux.

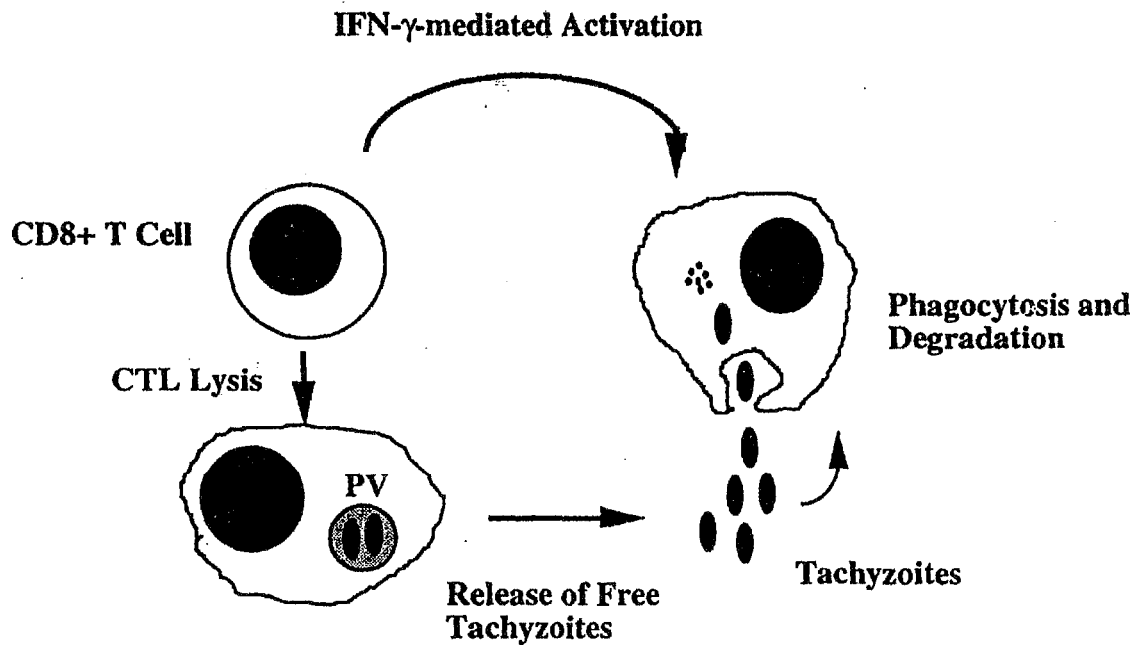


Figure 5 : Activité cytolytique des CD8+

Ce système intervient plutôt dans la phase chronique : c'est un excellent moyen de neutraliser le bas niveau de tachyzoïtes qui se réactivent. Le fait que des souris déficientes en perforine soient plus susceptibles que les souches sauvages durant la phase chronique appuie cette théorie (Denkers EY *et al*-1997).

❖ Les lymphocytes CD4+

▪ Rappels

On distingue deux sous-populations de lymphocytes CD4+ en fonction du profil des cytokines qu'elles sécrètent après stimulation antigénique itérative. Aux stades initiaux de l'infection, les deux sous-populations sont en équilibre et cet équilibre varie au cours du temps.

- Les lymphocytes Th1 (appelés anciennement cellules T inflammatoires) activent la cytotoxicité des macrophages en induisant la fusion de leurs lysosomes avec les vésicules contenant les pathogènes et en stimulant les autres mécanismes phagocytaires. Ils augmentent les réponses protectrices contre les protozoaires intracellulaires en produisant principalement de l'interleukine-2 (IL-2) et de l'IFN- γ .

- Les Th2 (ou cellules auxiliaires) jouent un rôle central dans la destruction des pathogènes extracellulaires en activant les lymphocytes B, induisant leur multiplication et leur différenciation en cellules aptes à sécréter des anticorps. Ils sécrètent les IL-4, 5, 6, 10 et 13.

Les cytokines Th1 et Th2 sont mutuellement antagonistes (l'IFN- γ est antagoniste des cellules Th2 tandis que l'IL-4 bloque l'activité des Th1), et la sous-population T qui prédomine décide l'issue de l'infection. Le résultat dépend de l'espèce du parasite et il est souvent imprévisible. Dans le cas de la toxoplasmose, la résolution de l'infection aiguë chez les souris résistantes est médiée par une réponse de type Th1. C'est l'IL-12 produite par les macrophages qui oriente la polarisation des cellules T helper CD4+ dans le sens Th1. A l'inverse, le développement d'une réponse de type Th2 favorise la dissémination des parasites chez les souris sensibles.

La dichotomie Th1/Th2 est remplacée aujourd'hui par une classification plus large en cytokines de type 1 et de type 2 qui tient compte du fait que des populations cellulaires autres que les lymphocytes T CD4+ peuvent produire des cytokines.

Les CD8+, les monocytes-macrophages et les cellules dendritiques participent à la réponse de type 1 tandis que les mastocytes et les éosinophiles participent à la réponse de type 2.

▪ Rôle des CD4+ dans le modèle murin

Ces cellules produisent des cytokines. *In vitro*, on observe :

- une synthèse spontanée d'IFN- γ par les cellules T CD4+ non sensibilisées, déclenchée par l'IL-12 produite par les macrophages activés par le parasite.
- une production plus tardive, par les CD4+ sensibilisées qui émergent de la population des cellules T.

Les CD4+ aident également à l'installation des mécanismes effecteurs en produisant de IL-2 et en régulant positivement les autres molécules co-stimulatrices nécessaires à l'activation des CD8+.

Bien que les CD4+ produisent *in vitro* une grande quantité d'IFN- γ suite à la stimulation antigénique, leur capacité à sécréter cette cytokine durant l'infection *in vivo* reste limitée, la plupart des cellules infectées par le parasite étant porteuse des molécules de type I du CMH.

▪ Chez l'homme

In vitro, la stimulation des cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC : peripheral blood mononuclear cell) avec des cellules présentatrices de l'antigène (CPA) non fixées, infectées par *T. gondii*, entraîne une forte prolifération des cellules T CD4+ CMH II. Trop peu de cellules cytotoxiques sont générées pour pouvoir les détecter.

Une cytotoxicité spécifique apparaît lorsque des extraits antigéniques sont utilisés. Elle est portée par les CD4+ et est présente dans toutes les expériences, quelque soit l'haplotype HLA du donneur ou la souche de toxoplasme utilisée.

La prolifération des CD8+ n'est visible que lorsqu'on utilise des charges antigéniques très importantes, mais reste nettement inférieure à celle des CD4+. Les conditions de l'expérience n'influencent pas la réponse : le stimulus de la phyto-hémagglutinine (PHA) provoque une propagation des CD8+, propagation gênée par l'ajout de CPA infectées. De plus, la fixation des CPA infectées permet, elle aussi, la multiplication des CD8+. Ces données combinées montrent que les CPA infectées sont immunogènes pour les CD8+ CMH I mais que des facteurs suppresseurs compromettent leur croissance. Aucune publication n'a fait mention de cytokines délétères pour les CD8+.

Il se peut également que l'activité super-antigène du toxoplasme observée chez la souris, s'exerce également chez l'homme : les précurseurs CD8⁺ sont supprimés peu de temps après leur stimulation. Il aurait fallu démontrer une mort cellulaire par apoptose dans les cultures cellulaires pour valider cette hypothèse, chose qui n'a pas été faite.

Les CTL CD4⁺ restreintes par le CMH II sont donc les principales cellules effectrices chez des individus asymptomatiques, en phase chronique de la maladie. Ceci pourrait expliquer la propension de *T. gondii* à réapparaître au niveau du tissu cérébral et rétinien où l'expression du CMH II est presque complètement absente (Curiel TJ *et al*-1993 ; Purner MB *et al*-1996).

b. Les macrophages

Les cellules de la lignée des monocytes-macrophages sont très hétérogènes par leur morphologie et leur localisation. Ces cellules comprennent les monocytes du sang et les macrophages tissulaires. Une fois fixés dans les tissus, les macrophages résidents sont susceptibles de persister très longtemps. L'ensemble constitue le système des phagocytes nucléés ou système réticulo-histiocytaire appelé autrefois réticulo-endothélial.

❖ Fonctions des macrophages

▪ CPA (Denkers EY *et al*-1993)

Ils participent à l'initiation de la réponse cellulaire T par la dégradation et la présentation des antigènes en association avec les molécules du CMH.

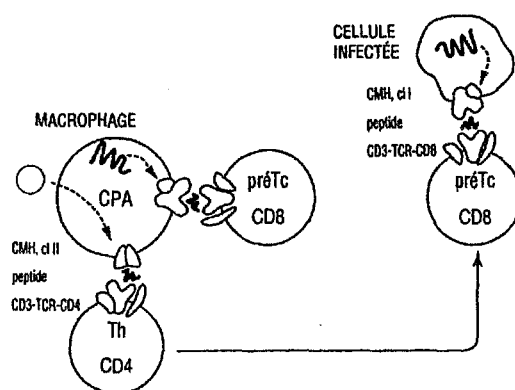


Figure 6 : Présentation de l'antigène par les macrophages

- Production de cytokines (Gazzinelli RT *et al*-1996)

L'infection à toxoplasme déclenche une forte production d'IL-12 par les monocytes-macrophages qui oriente la polarisation Th1 par action directe (sur les lymphocytes CD4+) et indirecte (induction de production d'IFN- γ par les cellules NK).

Ils sécrètent également d'autres cytokines comme le TNF- α et l'IL-1.

- Destruction des parasites

Ils assurent d'abord la première ligne de défense de l'organisme par un mécanisme non spécifique, d'action rapide : la phagocytose (Sibley LD *et al*-1993).

Les macrophages sont les principales cellules à l'intérieur desquelles se multiplient les toxoplasmes. Cependant, une fois activés, les macrophages sont capables de détruire les parasites intracellulaires ou de diminuer leur multiplication.

L'expression maximale des propriétés fonctionnelles des macrophages nécessite une étape d'activation par les médiateurs TNF- α et IFN- γ .

L'activation survient en général à un stade précoce de l'infection : les fonctions effectrices des macrophages sont augmentées par des mécanismes indépendants des cellules T tels que :

- la sécrétion d'IFN- γ par les cellules NK, stimulées par l'IL-12 produite elle-même par les macrophages.
- la sécrétion de TNF- α

Au stade effecteur de la réponse des cellules T, les macrophages assurent la lyse des parasites intracellulaires grâce à la production de dérivés actifs de l'oxygène (Murray HW *et al*-1979).

Une NADPH oxydase transforme l'oxygène moléculaire en anions superoxydes, qui en présence de superoxyde dismutase, sont transformés en eau oxygénée. En présence de sels de fer, il y a production de l'oxygène singulet et de radicaux hydroxyles. Ces dérivés sont toxiques pour le toxoplasme et, lorsqu'ils sont produits en quantité importante, pour le phagocyte lui-même qui est altéré.

Une deuxième voie métabolique semble jouer un rôle encore plus important : il s'agit de la formation de dérivés oxydés de l'azote aboutissant à la production de monoxyde d'azote (NO) (Adams LB *et al*-1990).

❖ Le NO

Le rôle du NO dans la communication cellulaire est connu depuis longtemps mais c'est seulement depuis quelques années que son rôle dans l'immunité a été démontré. Pour *T. gondii*, la résistance naturelle à l'infection, qui disparaît chez les sujets immunodéprimés, semble due à l'inhibition de la croissance du parasite par le NO.

▪ Synthèse du NO

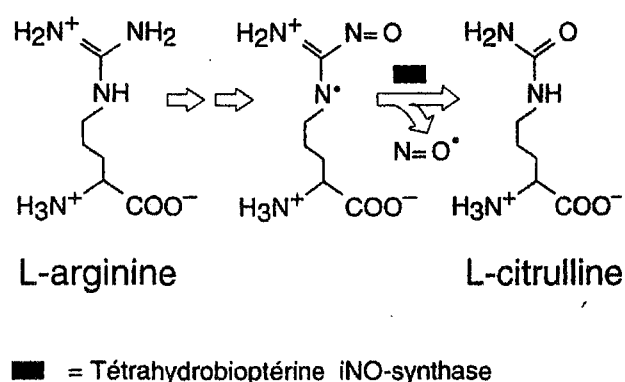


Figure 7 : Production du NO

Le NO est formé à partir de la L-arginine en présence d'une NO-synthase qui utilise comme cofacteur indispensable la tétrahydrobioptérine. Trois isoformes de NO-synthase ont été caractérisées : deux constitutives dans l'endothélium (eNOS) et le système nerveux (nNOS) et une inducible (iNOS) dont l'expression est prédominante dans les phagocytes, mais qui peut être induite par les cytokines dans toutes les cellules nucléées.

Le NO peut être transformé en dérivés tels que le nitrosonium, les ions nitroxyles, le dioxyde d'azote, le peroxyxynitrite et les S-nitrosothiols qui entraînent de multiples altérations des lipides, protéines, glycanes, acides nucléiques des parasites.

Le NO peut être produit par de nombreuses cellules (cellules endothéliales, épithéliales, fibroblastes, hépatocytes, polynucléaires neutrophiles...) mais c'est le macrophage qui est la principale source. L'expression du NO par les macrophages nécessite une étape d'activation par les médiateurs IFN- γ et TNF- α . L'interaction induit une cascade d'évènements : elle stimule la production d'« interferon regulatory factor 1 » (IRF-1) qui se lie à la région promoteur de plusieurs gènes inductibles par l'IFN- γ et notamment l'iNOS.

L'immunologiste dispose de toute une série de molécules chimiques affectant cette voie :

- la L-N⁶-iminoéthyl-lysine ou L-NIL est un inhibiteur sélectif de l'iNOS.
- la L-nitroarginine-méthylester ou L-NAME inhibe toutes les isoformes de NOS avec une préférence pour les enzymes constitutives des neurones et des endothéliums. Cette molécule n'est guère utilisée en raison de sa neurotoxicité.
- l'aminoguanidine et la N^G-monométhyl-L-arginine (L-NMMA) sont des analogues structuraux de la L-arginine et antagonisent la synthèse de NO par un phénomène compétitif.

▪ Effet antiparasitaire du NO

L'implication des dérivés nitrés est basée sur l'observation que la L-NMMA, inhibe simultanément la synthèse de NO et la lyse des tachyzoïtes intracellulaires par les macrophages et les cellules de la microglie (Adams LB *et al*-1990 ; Chao CC *et al*-1993).

La « voie » du NO est incertaine chez l'homme mais bien établie chez la souris :

- des souris portant des anomalies génétiques sur le gène de l'IFN- γ ou IRF-1 ko meurent toutes en 14 jours (Khan IA *et al*-1996).
- l'infection par la souche ME49 de souris C57BL/6 traitées avec l'aminoguanidine se solde par une augmentation de la charge parasitaire aussi bien périphérique que centrale. L'organisme arrive à éliminer les parasites au niveau périphérique mais ne contrôle pas la multiplication cérébrale : l'inflammation associée à une augmentation du nombre de kystes et de tachyzoïtes provoque une encéphalite mortelle (Hayashi S *et al*-1996).

- l'implication du NO dans la diminution de la charge parasitaire cérébrale est confirmée par l'étude de Scharton-Kersten *et al*-1997. Les souris iNOS^{-/-} infectées par 20 kystes de la souche ME49 présentent une charge kystique deux fois plus élevée que des souris de génotype normal et de nombreuses zones de nécrose (témoins d'une multiplication active des tachyzoïtes). La mortalité survient 19 à 24 jours après l'infestation.

Leur conclusion va cependant à l'encontre de tous les articles publiés auparavant : la principale fonction des dérivés du NO est de maintenir le contrôle de l'infection établie et n'intervient pas comme le mécanisme initial de la défense innée.

En effet, le modèle présenté est un modèle intermédiaire de susceptibilité. L'hôte survit à l'infection aiguë car il est capable de contrôler la croissance parasitaire au site d'infection (à J5, le pourcentage de cellules péritonéales infectées est comparable au groupe témoin). Les frottis cardiaque, pulmonaire, hépatique et splénique n'ont pas montré de réplication, contrairement aux souris déficientes en IFN- γ .

- Schluter D *et al*-1999, ont exploré la fonction du NO lors de la phase chronique chez deux souches exprimant l'iNOS au niveau cérébral.

Le NO est important chez la souche C57BL/6. Ces souris, très susceptibles, meurent d'une encéphalite toxoplasmique chronique progressive par manque de réponses immunes intracérébrales (bas niveau de TNF- α et d'IFN- γ). De part leur déterminant génétique, elles possèdent un nombre limité de CD8⁺ mais beaucoup de macrophages, source de NO, mécanisme compensatoire. L'expression de l'iNOS est corrélée avec le nombre de kystes cérébraux et l'inhibition de la synthèse de NO exacerbe l'encéphalite. La mort est rapide en moins de 14 jours.

Les souris BALB/c développent une latence : l'injection de L-NAME ou L-NIL n'a aucune répercussion sur la diminution constante du nombre de kystes. Chez l'homme, l'expression limitée de l'iNOS chez les immunocompétents prouve que la latence est également contrôlée d'une manière indépendante du mécanisme iNOS/NO.

Les divergences du rôle du NO peuvent donc être expliquées par l'environnement (facteurs spécifiques de certains organes) ainsi que par le statut génétique de l'hôte.

- Effet pathologique du NO

En se basant sur sa remarquable capacité à tuer les neurones et le fait que l'iNOS soit détectable lors de maladies dégénératives (Alzheimer), il a été suggéré que le NO soit neurotoxique pour le SNC.

- Effet immunorégulateur

Nous verrons que la suppression de la synthèse de NO restaure la lymphoprolifération. Ces observations ont été faites dans la phase très précoce de l'infection, après seulement une semaine.

- Effet sur la différenciation du parasite

Les molécules générant du NO comme le nitroprussiate induisent la conversion tachyzoïte-bradyzoïte *in vitro* (Bohne W *et al*-1993-1994).

Cependant, la capacité de souris ayant perdu le gène codant pour la NO synthase inductible, à former des kystes, suggère que si le NO participe à la transformation des parasites prolifératifs en parasites quiescents, cette molécule n'est ni indispensable, ni la seule impliquée (Khan IA *et al*-1998).

c. Les polynucléaires neutrophiles (PNN)

❖ Implication des PNN

- Les PNN sont, en général, les premières cellules à arriver au niveau du site de l'infection. Les granulocytes possèdent la capacité de migrer rapidement en réponse aux signaux chimiotactiques sécrétés par le toxoplasme (Nakao M *et al*-1991).

- Les animaux traités par des anticorps anti-GR1 sont incapables de survivre plus de 11 jours à une infection orale par des kystes de la souche ME49 (Sayles PC *et al*-1996-1997).

❖ Fonctions des PNN

- Par leurs récepteurs de complément et Fc, les PNN fixent et phagocytent les particules opsonisées par le complément et les anticorps. Si la particule est de petite taille, elle est englobée par la membrane avec formation d'une vacuole de phagocytose. Le contenu des granules des PNN est libéré dans cette vacuole et la bactéricidie commence. La principale réaction implique une forte et brutale consommation d'oxygène et met en jeu deux enzymes clefs : la NADPH-oxydase et la myéloperoxydase. Il y a également libération extracellulaire de cytokines et du contenu des granules, responsables de lésions tissulaires.

- Suite à une injection de tachyzoïtes RH vivants, il y a afflux des PNN dans la cavité péritonéale et cet afflux est corrélé à une augmentation des transcrits pour l'IL-12. *In vitro*, les PNN produisent des taux élevés en IL-12 et des niveaux bas mais significatifs en TNF- α lorsqu'ils sont stimulés par des antigènes toxoplasmiques, et ceci, en l'absence d'IFN- γ . La production d'IL-12 est précoce, ne nécessitant pas l'intervention du TNFR p55. La libération de TNF- α est également indépendante de celle d'IL-12 (Bliss SK *et al*-1991).

- La stimulation des PNN résulte en une induction rapide des ARNm des MIP-1 α (macrophage inflammatory protein-1 α) et MIP-1 β .

Les MIP-1 sont des cytokines chimiotactiques appartenant à la famille CC des chémokines qui exercent des activités biologiques diverses. Les MIP-1 α et β ont une activité chimotactique pour les macrophages, les NK et les cellules dendritiques (Susan K. Bliss *et al*-1999). L'augmentation des MIP dépend en grande partie du TNF- α et la transcription reste élevée pendant plus de 12 heures.

d. Les natural killer cells (NK)

Les mécanismes de la réponse innée jouent un rôle important dans la croissance des tachyzoïtes. En dépit de l'absence des cellules T, des souris athymiques résistent à l'infection pendant plusieurs semaines (Lindberg RE *et al*-1977).

Ce contrôle transitoire du développement parasitaire est attribué à deux phénomènes : cytotoxicité et production d'IFN- γ .

❖ Cytotoxicité

Toute cellule infectée exprimant à sa surface des antigènes étrangers peut être détruite par un mécanisme de cytotoxicité à médiation cellulaire. Plusieurs populations cellulaires ont la propriété de lyser ces cellules (Perussia B *et al*-1991). Elles comprennent essentiellement :

- des cellules que l'on peut activer en culture par des concentrations relativement élevées en IL-2 : les LAK (Lymphokine-Activated Killer cells).

- des cellules, dérivées des grands lymphocytes, présentes normalement dans la rate et le sang : les NK. Ces cellules mononuclées possèdent une activité cytotoxique, non spécifique de l'antigène, dirigée contre certaines cellules cibles et notamment envers les tachyzoïtes de *T. gondii*, indépendamment de toute sensibilisation préalable et de toute restriction au CMH (Hauser WE *et al*-1986).

Les cellules NK sont susceptibles d'intervenir dans les premières heures, bien avant l'installation de l'immunité spécifique. Ceci explique que le traitement par un anticorps monoclonal anti-NK 1.1 rend des souris résistantes à *T. gondii*, nettement plus sensibles.

D'après Scharton-kersten T *et al*-1996, le parasite stimule le développement d'une forte réponse NK, dont la cytotoxicité dépend de l'IL-12. Cette cytotoxicité est amoindrie chez les souris IFN- γ -. L'IFN- γ régule indirectement la fonction NK en augmentant la synthèse d'IL-12 et le niveau des récepteurs pour cette cytokine (Presky DH *et al*-1996). Il est intéressant de noter qu'un anticorps anti-IL-12 abolit les réponses cytotoxiques des NK sans affecter la cinétique de mortalité des souris GKO. La fonction principale des NK est donc la synthèse d'IFN- γ plutôt que la cytotoxicité. D'ailleurs, des souris perforine KO, ayant perdu leur activité NK cytotoxique, ne sont pas atteintes dans leur capacité à contrôler l'infection.

❖ Production d'IFN- γ indépendante des cellules T

Les NK jouent un rôle non négligeable dans les infections parasitaires par l'intermédiaire de leur production d'IFN- γ , production dépendante des macrophages et du TNF- α (Sher A *et al*-1993).

L'émergence d'une population NK productrice d'IFN- γ chez les souris portant une altération du gène codant pour la β_2 -microglobuline permet de compenser la perte des CD8+ périphériques (Denkers EY *et al*-1993).

2. Les cytokines

Ce terme regroupe un ensemble hétérogène de molécules solubles dont certaines sont appelées interleukines, interférons et facteurs de nécrose de tumeurs. Tous ces messagers chimiques sont des protéines le plus souvent glycosylées, dont la masse moléculaire varie de 8 à 50 kDa.

Le rôle des cytokines dans les infections parasitaires a été démontré par l'injection de cytokines et d'anticorps monoclonaux anti-cytokines à des animaux infectés. Ce rôle a été précisé par l'étude d'infections expérimentales chez des souris transgéniques pour une cytokine ou chez des souris dont le gène d'une cytokine a été inactivé (souris «KO» abréviation de «knockout»). De nombreuses cytokines agissent sur les cellules effectrices en stimulant leurs propriétés cytotoxiques mais fonctionnent aussi comme facteurs de croissance pour ces cellules.

a. Interleukine 12 : IL-12

C'est une cytokine hétérodimérique (p35 et p40) produite surtout par les monocytes-macrophages et les cellules dendritiques (Johnson LL *et al*-1997).

L'induction initiale de l'IL-12 est apparemment indépendante de l'IFN- γ : des souris GKO, déficientes en IFN- γ , peuvent produire de l'IL-12 fonctionnelle (Scharton-Kersten T *et al*-1996). Néanmoins, 5 jours après le début de l'infection, le niveau d'IL-12 p40 est très faible car les synthèses d'IL-12 et d'IFN- γ sont régulées de manière coordonnée : l'IFN- γ est capable d'augmenter la production d'IL-12 et vice versa (Brunda MJ-1994).

L'administration d'IL-12 exogène à des souris SCID, dépourvues en cellules T et B, infectées par des kystes de *T. gondii*, permet d'augmenter leur durée de vie alors que l'administration d'anticorps anti-IL12 résulte en une mort précoce (Gazzinelli RT *et al*-1993 ; Hunter CA *et al*-1994). Ce mécanisme n'est pas un mécanisme compensatoire propre aux souris immunodéprimées : l'importance de l'IL-12 endogène dans la résistance des souris immunocompétentes est illustrée par l'expérience de Hunter CA *et al*-1995 dans laquelle l'administration d'anticorps anti-IL-12 provoque 100% de létalité chez des souris normalement résistantes à l'infection.

L'IL-12 intervient très précocement dans le processus protecteur (Khan IA *et al*-1994) :

- L'IL-12 n'augmente la protection des souris A/J que lorsqu'elle est administrée au moment du challenge ; 3 jours après, le bénéfice apporté par cette cytokine sur le taux de mortalité n'est plus visible.
- De la même manière, un anticorps anti-IL-12 augmente la susceptibilité lorsqu'il est administré le jour même de l'infection et de manière continue mais n'est plus actif 3 jours après le challenge.

Le mécanisme protecteur de l'IL-12 fait intervenir les NK et l'IFN- γ :

- la déplétion en IFN- γ et en NK annule l'effet protecteur de l'IL-12.
- l'analyse phénotypique des splénocytes par la technique FACS montre une augmentation de 9.8% des NK dans le groupe traité précocement par IL-12. En comparaison, l'élévation des NK dans le groupe ne recevant pas d'IL-12 n'est que de 2.3%.
- la production d'IFN- γ est augmentée chez les souris traitées par IL-12 au moment du challenge. Ceci se traduit par une plus forte synthèse d'IL-2, le nombre de CD4⁺ restant inchangé.

Les études sur le rôle de l'IL-12 se sont multipliées ces dernières années :

- les souris IL-12 p40^{-/-} ne survivent pas à l'infection car elles sont déficientes en IFN- γ et NO (Scharton-Kersten T *et al*-1995).
- l'IL-12 est incapable d'influencer la survie des souris GKO (Scharton-Kersten T *et al*-1996).
- l'expression des ARNm pour les différentes cytokines a été mesurée par RT-PCR dans les cellules péritonéales et les splénocytes de souris B6 infectées par une souche avirulente ME49. Une augmentation d'IL-12 est détectée 2 jours après l'infection dans les cellules péritonéales et 3 jours après dans les splénocytes. Le pic est atteint au 5^{ème} jour. L'expression des TNF- α et IFN- γ suit une courbe similaire à celle de l'IL-12. La neutralisation de l'IL-12 se traduit *in vivo* et *in vitro* par une baisse de l'IFN- γ et une augmentation de la synthèse des cytokines de type 2 (IL-4 et IL-10) par les splénocytes lorsque l'on est en phase aiguë mais pas en phase chronique (Gazzinelli RT *et al*-1994).

Ces quelques exemples montrent que les conclusions ne diffèrent pas d'une expérience à l'autre et que la synthèse d'IL-12 joue un rôle primordial dans l'infection aiguë mais n'intervient pas lorsque l'immunité est déjà établie.

b. IL-10

L'IL-10 est une cytokine pléiotropique produite essentiellement par les lymphocytes Th2 mais aussi par les lymphocytes B, les monocytes/macrophages et les mastocytes.

- Gazzinelli RT *et al*-1996 ont précisé le rôle joué par l'IL-10 dans la toxoplasmose en infectant des souris IL-10 KO avec la souche ME49. Toutes les souris de l'expérience succombent durant les deux premières semaines de l'infection. L'analyse par RT-PCR des niveaux hépatiques et pulmonaires d'ARNm codant pour la protéine du tachyzoïte SAG2 et les examens histopathologiques de ces tissus n'ont pas révélé de dissémination parasitaire. Les anomalies tissulaires, infiltration et nécrose très prononcées au niveau du foie, font penser que la mort des souris n'est pas due à une prolifération incontrôlée des parasites mais à une réponse immune anormale de l'hôte, ressemblant à celle du choc septique. Les différents dosages réalisés ont confirmé l'exagération de la production splénique en IL-12 et IFN- γ (4 à 6 fois supérieures aux animaux contrôle) et des ARNm pulmonaires codant l'IFN- γ , le TNF- α et l'IL-1 β .

- Murray PJ *et al*-1997 ont utilisé des souris transgéniques dont les cellules T sécrètent des quantités importantes d'IL-10. Ces souris, malgré une production abondante en IL-2 et IFN- γ , sont incapables d'éliminer les parasites. L'IL-10 produit en excès n'a donc que peu d'effet sur les réponses cellulaires T.

L'IL-10 agit principalement sur les macrophages en contournant le signal d'activation délivré par l'IFN- γ . En inhibant l'activation macrophagique, il régule négativement l'expression des cytokine pro-inflammatoires (IL-12, IL-1 β , TNF- α) et par conséquent la synthèse d'IFN- γ (Gazzinelli RT *et al*-1992 ; Neyer LE *et al*-1997).

- Ce n'est pas le niveau en IL-10 qui importe mais le rapport IL-10/IL-12. Un rapport bas favoriserait le développement d'une réponse Th1 alors qu'un rapport élevé l'abolirait (Meyaard L *et al*-1996). Nous verrons que l'élévation du rapport se voit lors d'infections par les lentivirus.

La première réaction de l'organisme en réponse à *T. gondii* est la production d'IL-12 par les macrophages. Une fois l'infection établie, le parasite stimule la production d'IL-10 permettant d'annuler la production d'IL-12 et réduisant de ce fait les niveaux d'IFN- γ et d'IL-2. La phase chronique peut alors se développer.

Cet équilibre permet de garder l'hôte en vie :

- les cytokines de types 1 empêchent une réplication parasitaire incontrôlée, potentiellement létale,
- l'IL-10 prévient une réponse Th1 excessive : la sensibilité des souris C57BL/6 à l'infection aiguë est liée à une réponse immunitaire Th1 délétère avec surproduction d'IFN- γ .

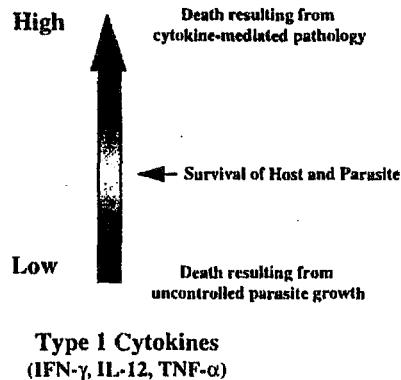


Figure 8 : Production de cytokines de type 1

c. Cytokines et immunodéficience

Le développement du VIH est classiquement associé à une diminution des CD4⁺ ; Miedema F *et al*-1988 insistent sur le fait qu'une altération des fonctions T helper a lieu bien avant le déclin des CD4⁺. Selon Clerici M *et al*-1989-1993, le VIH induit une réponse Th2 prédominante. La diminution de l'IFN- γ et de l'IL-12 associée à l'augmentation des IL-4, IL-6 et IL-10 constatées chez certaines personnes HIV⁺ est la base de leur hypothèse.

Bien que la déficience en réponse de type 1 explique les infections opportunistes rencontrées chez les sidéens, les changements dans l'expression des cytokines restent sujets à controverse : Maggi E *et al*-1994, ont examiné un grand panel de clones de cellules T issus de patients infectés par le VIH et ont retrouvé un profil de type 0. Ceci est confirmé par les travaux de Prigione I *et al*-1994 et de Graziosi C *et al*-1994.

Ces derniers ont montré une élévation en IL-10 et IFN- γ dans les ganglions lymphatiques de sujets infectés. L'augmentation des ARNm des IL-10, IFN- γ et TNF- α , visible également dans les PBMC d'enfants infectés, s'accompagne d'une diminution en ARNm pour l'IL-12 (Than S *et al*-1997).

L'hétérogénéité de la population des patients, au niveau de la charge virale, de la progression de la maladie et de l'exposition aux pathogènes rendent les comparaisons et les études difficiles. L'expression des cytokines a donc été évaluée dans un modèle animal, le chat (Levy JK *et al*-1998 ; Lappin MR *et al*-1993).

Le FIV (virus de l'immunodéficience félin) est un lentivirus similaire morphologiquement et biochimiquement au VIH. L'infection par le FIV chez le chat imite en tout point l'infection VIH chez l'homme. Lors de la phase asymptomatique de l'infection, l'élévation des TNF- α , IFN- γ et IL-10 permet d'exclure une prédominance des réponses Th2. Par contre, le rapport IL-10/IL-12 est élevé, s'échelonnant de 2 à 10 alors qu'il est voisin de 1 chez les chats FIV-.

Les chats co-infectés par le FIV et des toxoplasmes développent des pneumonies interstitielles se soldant par une mortalité de l'ordre de 50 à 75%. En contraste, l'inoculation de tachyzoïtes ME49 chez des chats sains résulte en des signes cliniques peu sévères (choriorétinite en particulier).

Chez les chats co-infectés, aucune augmentation d'IL-2, d'IL-12 et de TNF- α n'a lieu mais la sécrétion d'IFN- γ est déclenchée.

Le principal changement concerne l'IL-10 qui est multipliée par 3.5 par rapport au groupe témoin. L'augmentation d'IL-10 en l'absence d'augmentation d'IL-12 se traduit par un rapport IL-10/IL-12 anormalement élevé (4.8 contre 0.39 chez les témoins).

Même s'il y a production d'IFN- γ , le niveau élevé en IL-10 chez les chats FIV+ avant le challenge, abolit la réponse macrophage. La perte de résistance chez les chats infectés par le FIV est donc due à la déficience en cytokines de type 1 IL-12 et IL-2.

L'immunodéficience est donc caractérisée par :

- un défaut intrinsèque dans la production d'IL-12 et/ou de TNF- α par les macrophages,
- des signaux régulateurs négatifs provenant des cellules T.

d. IFN- γ : rôle pivot (Suzuki Y *et al*-1988)

Tous les chercheurs sont unanimes sur le fait que l'IFN- γ représente la cytokine majeure de résistance à *T. gondii*.

❖ Expériences

L'IFN- γ est impliqué dans tous les mécanismes de la réponse adaptative et innée et intervient aussi bien en phase aiguë que chronique.

- L'administration d'IFN- γ protège les souris d'une infection létale, alors que les toutes les souris traitées avec des anticorps monoclonaux anti-IFN- γ meurent dès le début de l'infection provoquée avec une souche non virulente. Les souris IFN- γ -, contrairement au type sauvage, succombent 9 jours après l'inoculation de kystes de la souche avirulente ME49. Leur susceptibilité est liée à une réplication incontrôlée des tachyzoïtes au niveau périphérique (les examens histopathologiques ont révélé des tachyzoïtes dans les poumons et le foie, signes de métastases de l'infection). En l'absence d'IFN- γ , aucun phénomène compensatoire n'est présent, même au niveau intestinal : les souris déficientes en récepteurs pour l'IFN- γ , infectées par voie orale, meurent en moins de 10 jours d'une lymphadénite intestinale et d'une nécrose hépatique (Subauste CS *et al*-1991 ; Scharton-Kersten T *et al*-1996 ; Deckert-Schluter M *et al*-1996).

- Le traitement par des anticorps anti-IFN- γ , chez des souris en phase chronique, provoque l'apparition de tachyzoïtes libres au niveau cérébral. L'IFN- γ serait donc essentiel pour maintenir les kystes quiescents (Suzuki Y *et al*-1989).

❖ Source d'IFN- γ

L'IFN- γ est produit par les cellules NK et les lymphocytes T CD4 Th1 et CD8 stimulés par des superantigènes ou par un peptide présenté en association avec une molécule du CMH.

Les cellules spléniques de souris SCID produisent de hauts niveaux en IFN- γ lorsqu'elles sont exposées à des tachyzoïtes vivants ou à des extraits parasitaires solubles.

Il y a donc production d'IFN- γ dès la phase très précoce de l'infection toxoplasmique, bien avant l'installation de l'immunité adaptative. A ce moment là, ce sont les NK activées par l'IL-12 qui sont responsables d'une partie de la synthèse de cette cytokine (Denkers EY *et al*-1997). Il apparaît également que l'IFN- γ est issu des cellules T stimulées par des superantigènes.

❖ Action

Il agit sur les macrophages et autres cellules non phagocytaires qui à leur tour limitent la réplication intracellulaire.

→ Il induit la différenciation des macrophages et leur activation.

- L'IFN- γ en association avec le TNF- α a la propriété d'accroître la lyse intracellulaire en augmentant la production de dérivés actifs de l'oxygène et en stimulant la voie du monoxyde d'azote (Murray HW *et al*-1995 ; Langermans J *et al*-1992).

- L'IFN- γ dérivé de cellules stimulées par le parasite comme les NK est nécessaire pour initier la production d'IL-12 par les macrophages (Scharton-Kersten T *et al*-1997). D'après Ma X *et al*-1996, l'activation du promoteur de l'IL-12 p40 par différents stimuli n'a lieu que lorsque les macrophages sont sensibilisés au préalable avec de l'IFN- γ . Ce résultat a été réfuté par de nombreux chercheurs mais quoi qu'il en soit, *T. gondii* induit positivement la transcription du récepteur de l'IL-12 et l'augmentation des taux d'ARNm pour IL-12R β est largement dépendante de IFN- γ .

- L'IFN- γ induit l'expression d'une 1-hydroxylase dans les macrophages humains mais apparemment pas dans les macrophages de souris. Cette enzyme permet de transformer le 25-OH-cholécalciférol circulant inactif en calcitriol. En se liant à des récepteurs spécifiques, ce dérivé exerce des effets coactivateurs des macrophages et des effets inhibiteurs sur les lymphocytes Th1. Le calcitriol peut représenter l'un des mécanismes qui font basculer une réponse Th1 vers le type Th2 lorsque l'organisme ne parvient pas à éliminer le parasite.

→ La réponse NK est en premier lieu dépendante de l'IL-12 mais est induite de manière maximale en présence d'IFN- γ .

→ *T. gondii* pénètre et prolifère dans des entérocytes de rats en culture. L'activation de ces entérocytes avec de l'IFN- γ inhibe la réplication du parasite (Dimier LH *et al*-1998). La même constatation a été faite avec d'autres types cellulaires : des cellules épithéliales de la lignée IEC-6 (Dimier IH *et al*-1993) et des cellules endothéliales (Woodman JP *et al*-1991).

→ L'IFN- γ stimule les fibroblastes à produire une enzyme : l'indoleamine 2,3-dioxygénase qui dégrade le tryptophane, privant le toxoplasme de cet acide aminé essentiel (Pfefferkorn ER *et al*-1984 ; Thomas SM *et al*-1993).

→ L'IFN- γ affecte l'activation des cellules B et leur différenciation. Il contrôle en particulier l'isotype des IgG qui sont sécrétées durant une réponse immune humorale *in vivo* : il stimule la sécrétion d'IgG2a et inhibe celles d'IgG1 et d'IgE (Finkelman FD *et al*-1988).

De la même manière, l'IFN- γ produit par les NK intervient très précocement dans le choix du profil Th1. Le parasite déclenche de manière intrinsèque la production de cytokines de type Th2 (IL-4 et 5) mais cette réponse est réversée par l'induction d'IFN- γ . L'absence d'IFN- γ chez les souris GKO se traduit par une augmentation des éosinophiles.

→ L'IFN- γ déclenche la synthèse de MuMig et Crg-2 chez la souris. Ces chémokines (dont les équivalents humains sont HuMig et IP-10) ont une activité chimotactique pour les lymphocytes T. Elles sont produites dans de nombreux organes, notamment dans la rate et le foie par les cellules CD11b⁺. Elles joueraient des rôles complémentaires, MuMig au niveau systémique, Crg-2 au niveau local (Amichay D *et al*-1996).

II. IMMUNITE HUMORALE

1. Réponse humorale

La réponse immunitaire humorale est directement liée à la synthèse d'immunoglobulines spécifiques par les lymphocytes B. Les lymphocytes se différencient en deux étapes : après la phase centrale de différenciation au niveau de la moelle osseuse, ils sont activés au sein des organes périphériques, subissent un processus d'expansion clonale et se transforment soit en lymphocytes B à mémoire, soit en plasmocytes sécréteurs d'anticorps.

Parmi les antigènes du toxoplasme, certains sont ubiquitaires et reconnus par des anticorps présents même chez le sujet non infecté (Potasman I *et al*-1986). D'autres lui sont propres et vont susciter l'apparition d'anticorps spécifiques appartenant aux différentes classes d'immunoglobulines. L'organisme élabore en premier lieu des immunoglobulines spécifiques dirigées contre la membrane, puis contre les constituants cytoplasmiques du parasite (Reccurt-Carrere MP *et al*-1987 ; Bessieres MH-1988).

a. Les IgM

Ce sont les premiers anticorps sécrétés. Ils sont produits dans la première semaine suivant la contamination, augmentent dans le mois suivant et persistent durant une période plus ou moins longue suivant les individus. La mise en évidence des IgM évoque une infection récente mais n'est pas suffisante pour l'affirmer car leur détection est fréquente au-delà d'un an après la contamination. La présence d'IgM n'a une signification qu'interprétée avec le dosage des IgG car des IgM non spécifiques peuvent interférer dans les réactions.

b. Les IgG

L'apparition des IgG authentifie une séroconversion toxoplasmique. Suivant les méthodes utilisées, les anticorps IgG ont une cinétique différente :

- ceux de spécificité antimembranaire (détectés par les tests de lyse) apparaissent une à deux semaines après la contamination. Leur taux augmente ensuite rapidement pour atteindre leur maximum deux mois après la contamination. Des titres élevés persistent pendant 6 à 8 mois minimum puis diminuent lentement. Les taux résiduels sont les témoins d'une immunité ancienne.

- avec des extraits antigéniques solubles (réaction d'hémagglutination), les anticorps sont détectés moins précocement. Le décalage dans la détection est fréquemment de 15 jours à un mois par rapport aux anticorps antimembranaires. Ils atteignent un maximum deux mois après la contamination.

Cette évolution est observée dans la majorité des infections. Des réponses humorales majorées, prolongées ou minimales peuvent être observées (Desmonts G *et al*-1985).

C'est l'ascension significative du titre des IgG sur deux prélèvements pratiqués à 3 semaines d'intervalle qui confirme le caractère récent de l'infection si elle est associée à des IgM.

c. Les IgA

La cinétique des IgA est moins bien documentée.

Les études de Bessière *et al* menées au CHU de Toulouse en 1992 ont démontré que les IgA ont une évolution parallèle à celle des IgM. Leur production est maximale 2 mois après le début de l'infection puis diminue rapidement dans les mois suivants (entre le 4^{ème} et le 7^{ème} mois).

Elles sont plus rarement détectées que les IgM à la phase chronique de l'infection ; de ce fait, la détection d'IgA spécifiques associée à celle des anticorps IgG et IgM est en faveur d'une infection récente.

Chez les patients immunodéprimés, notamment chez les VIH+, les réactivations sérologiques observées se caractérisent par une augmentation du titre des IgG fréquemment associés à la présence d'IgA spécifique sans production d'IgM.

d. IgE

La détection des IgE spécifiques n'est utile que dans certaines situations complexes. Ces anticorps ont une cinétique rapide et ne sont détectés qu'à la phase évolutive de la maladie. Ces anticorps, comme les IgA, ne sont donc jamais détectés dans les immunités anciennes sauf contexte particulier.

2. Rôle des anticorps

Les anticorps agissent selon plusieurs mécanismes :

- activation de la voie classique du complément détruisant la membrane du parasite,
- neutralisation par blocage du site de fixation du parasite,
- augmentation de la phagocytose par potentialisation de l'opsonisation (les IgG opsonisent et provoquent l'ingestion des toxoplasmes dans des vésicules de phagocytose qui fusionnent avec les lysosomes pour détruire le parasite, contrairement au mécanisme spontané de pénétration active).
- les anticorps peuvent déclencher des réactions de cytolyse qui mettent en jeu les plaquettes et les monocytes-macrophages.

Ces anticorps sont particulièrement importants dans l'élimination de la forme extracellulaire du parasite mais sont inefficaces dès que celui-ci a pénétré dans la cellule hôte.

Ils ne sont pas protecteurs :

- le transfert passif d'anticorps ne protège pas les souris contre l'infection toxoplasmique.
- de nombreux essais d'immunisation par des toxoplasmes morts ou irradiés ou par des extraits antigéniques ont entraîné la production d'anticorps sans pour autant apporter une protection contre l'infection.
- une immunité peut se développer chez des souris qui ne produisent pas d'anticorps.

L'immunité humorale et les cellules B ne jouent donc pas un rôle essentiel dans la résistance au toxoplasme. Elles limitent la prolifération des parasites en provoquant la lyse des tachyzoïtes extracellulaires mais sont insuffisantes pour stopper l'infection.

III. IMMUNITÉ LOCALE

Le système immunitaire est divisé en deux compartiments :

1/ le compartiment systémique comprend la moelle osseuse, la rate et les ganglions lymphatiques. Les anticorps associés à ce système sont principalement des IgG dont la fonction est de neutraliser les pathogènes présents dans le système circulatoire.

2/ le système muqueux avec le tissu lymphoïde associé aux muqueuses (MALT) et les glandes annexes. Les anticorps sont des IgA sécrétoires dont le but est de limiter l'entrée du pathogène.

1. Anatomie fonctionnelle du système immunitaire muqueux digestif

Les muqueuses représentent la plus grande surface de contact (40m^2) de l'organisme avec les antigènes, ce qui fait du système immunitaire muqueux le plus important des tissus lymphoïdes.

C'est le système immunitaire muqueux du tractus gastro-intestinal qui est le plus étudié (Chevailler A-Immunologie 3^{ème} Eds).

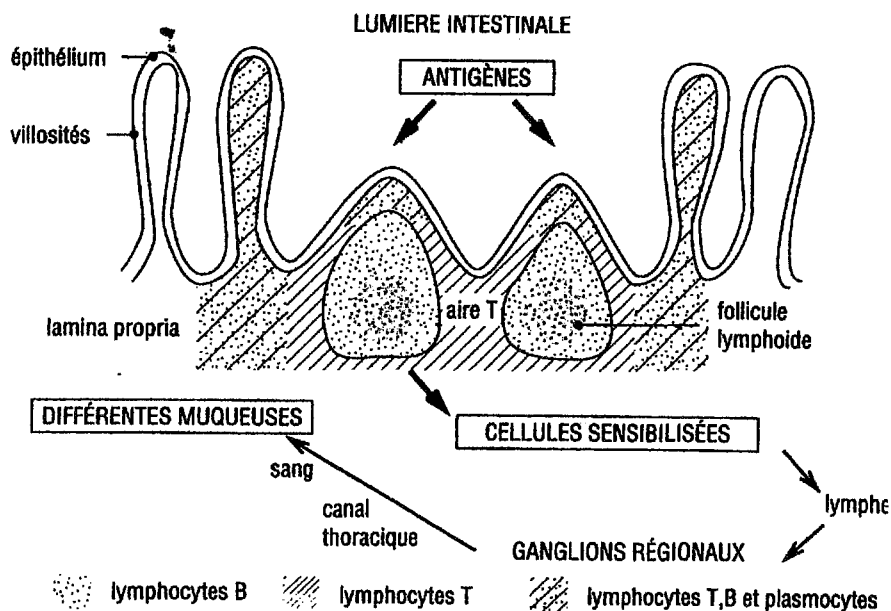


Figure 9 : Le GALT (gut associated lymphoid tissue)

Sur le plan histologique, on peut représenter le GALT avec une branche afférente et une branche efférente.

a. La branche afférente

Elle est représentée par des zones spécialisées de follicules lymphoïdes situés au sein d'entités anatomiques individualisées appelées plaques de Peyer (PP).

Ces formations lymphoïdes organisées sont les sites d'induction de la réponse immunitaire vis à vis de l'antigène pénétrant à travers l'épithélium.

Les volumineux agrégats de follicules siègent dans le chorion de la muqueuse intestinale et s'échelonnent du duodénum à l'iléon. Ils sont composés d'un réseau de cellules dendritiques folliculaires et de lymphocytes B IgM⁺/IgD⁺ organisés autour d'un centre germinatif riche en blastes IgA⁺ : après sensibilisation, les lymphocytes B IgM⁺ migrent de la zone parafolliculaire des PP vers le centre folliculaire où ils subissent une commutation isotypique vers IgA⁺.

Ils sont proches de la lumière intestinale, dont ils ne sont séparés que par un épithélium caractéristique : aminci, dépourvu de villosités, associant des cellules épithéliales cubiques, des cellules caliciformes et des cellules M (lettre provenant de microfold = microrepli). Ces cellules M captent les antigènes du tube digestif et les transfèrent sans dégradation vers les lymphocytes sous-jacents.

Cet épithélium recouvre un dôme où l'on trouve des cellules présentant l'antigène (macrophages et cellules interdigitées), des lymphocytes B et T CD4⁺.

En dessous se situent les follicules lymphoïdes avec des zones B séparées par des zones T indépendantes. Les PP n'ont pas de lymphatiques afférents mais sont riches en veinules post-capillaires assurant le transfert des lymphocytes du sang vers le tissu lymphoïde.

Les plaques de Peyer sont donc enrichies en précurseurs de lymphocytes B. Cependant, malgré la présence de toutes les sous-populations lymphocytaires requises, il n'y a pas de production d'IgA.

Après stimulation par l'antigène, les cellules T et B formées au sein des plaques de Peyer migrent vers les ganglions mésentériques où la prolifération clonale se poursuit et où survient la maturation en plasmoblastes à IgA intra-cytoplasmique ; puis par le canal thoracique, elles

gagnent le compartiment vasculaire : elles sont alors capables de revenir, après différenciation, dans le compartiment muqueux où elles sont responsables de la synthèse d'IgA. Elles peuvent se localiser au niveau de la lamina propria de l'intestin mais aussi dans d'autres territoires muqueux. Le passage des lymphocytes du sang vers les organes lymphoïdes secondaires se fait au niveau d'un épithélium spécialisé, cuboïdale, des veinules post capillaire (HEV : high endothelial venules).

Une des raisons qui fait considéré le MALT comme un système lymphoïde distinct des organes lymphoïdes systémiques est que les cellules lymphoïdes de ce système recirculent dans les territoires muqueux. Grâce à ce système d'écotaxie, la stimulation antigénique d'un territoire muqueux peut induire une réponse anticorps dans d'autres zones muqueuses.

b. La branche efférente

C'est le compartiment où prennent place les mécanismes effecteurs de la réponse immunitaire locale. Elle est représentée par deux populations cellulaires de répartition anatomique différente : les cellules de la lamina propria et les lymphocytes intraépithéliaux.

- La lamina propria est peuplée de cellules immunocompétentes : plasmocytes, CD4+, CD8+, CTL, NK, LAK... c'est le site de différenciation terminale des plasmocytes originaires des plaques de peyer. Ces plasmocytes sécrètent surtout des IgA dimériques qui vont être transportées par la cellule épithéliale vers la lumière intestinale et libérées sous forme d'IgA sécrétoires.

- Les lymphocytes intraépithéliaux (IEL) sont des lymphocytes T ayant une morphologie typique de grands lymphocytes granuleux.

2. Rôle des muqueuses dans la toxoplasmose (Chardes T *et al*-1992-1993)

McLeod R *et al*-1984 sont les premiers à avoir décrit l'apparition d'une immunité locale anti-*T. gondii* après infection orale chez la souris. Celle-ci se caractérise par la présence, au niveau des ganglions mésentériques, de quelques parasites et d'un grand nombre de macrophages et de plasmocytes deux jours après l'infection.

L'épithélium des muqueuses possède plusieurs propriétés qui concourent à sa participation aux réponses immunes :

- Il possède un rôle mécanique d'effet de barrière qui est cependant moins strict que celui du revêtement cutané. Des particularités anatomiques dans certains sites (contractilité, renouvellement rapide, ciliature) augmentent l'efficacité de ce système en chassant des antigènes.

- Son deuxième rôle est un rôle de transmission : de la lumière vers la muqueuse il transmet des signaux fournis par les antigènes aux lymphocytes de la lamina propria ; de la muqueuse vers la lumière il transporte les IgA sécrétoires.

Les IgA sécrétoires peuvent protéger les muqueuses par exclusion immune, terme générique décrivant la capacité de ces immunoglobulines à prévenir l'attachement des microorganismes ou des antigènes luminaux aux épithéliums muqueux. Ces IgA empêcheraient la pénétration dans les entérocytes (Mack DG *et al*-1992) mais également dans d'autres cellules : l'équipe de Chardes T *et al*-1990 a montré une inhibition de la multiplication de *T. gondii* dans des macrophages péritonéaux après leur incubation avec des sécrétions intestinales ou des laits contenant des IgAs anti-*T. gondii* préincubées durant 1 heure avec des tachyzoïtes.

- Il existe en son sein des lymphocytes, dits intra-épithéliaux, qui participent activement à la réponse immunitaire locale. Les IEL de phénotype CD8 α / β + produisent de l'IFN- γ et sont cytotoxiques envers les macrophages et les entérocytes infectés (Chardes T *et al*-1994). Le transfert de ces IEL, prélevés 11 jours après l'infection, protège les souris contre un challenge létal. Un mois après l'infection, la charge parasitaire intra cérébrale, nulle chez les BALB/c, est réduite de 90% chez les souris CBA/J (Buzoni-Gatel D *et al*-1997 et 1999).

3. Rôle des entérocytes

Les entérocytes sont les cellules épithéliales particulières, polarisées, qui tapissent la surface de la muqueuse intestinale. Elles constituent la barrière d'entrée de nombreux pathogènes et leur rôle potentiel dans la défense antitoxoplasmose a été étudié par Dimier IH et Bout DT-1998.

Les auteurs ont démontré que les entérocytes possèdent un pouvoir microbiostatique. Ils sont capables d'empêcher la multiplication intracellulaire de *T. gondii* après activation par l'IFN- γ . L'inhibition de la réplication est dose-dépendante et ne fait intervenir aucun des mécanismes habituellement impliqués (dérivés oxygénés, nitrés ou le tryptophane). Des expériences utilisant des sels de Fe^{++} et des chélateurs de fer indiquent que les entérocytes activés limitent la disponibilité du fer intracellulaire par un phénomène de chélation. Cette conclusion est en accord avec celle de Byrd TF *et al*-1989 : la multiplication de *L. pneumophila* est dépendante du fer puisé dans le stock labile de la cellule hôte. Les chercheurs ont émis l'hypothèse que les phagosomes contenant la bactérie sont en continuité avec le compartiment intracellulaire par lequel transite la transferrine et que la bactérie a accès au fer lorsque celui-ci se dissocie de la transferrine.

IV. CONCLUSION

Les animaux de laboratoires classiquement utilisés en immunologie, les rats et les souris, répondent de manière totalement différente à l'infection.

De l'ensemble des études faites chez les souris, il ressort que résistance à l'infection et statut génétique de l'hôte sont étroitement liés : après une infection intrapéritonéale avec la souche ME49 de *T. gondii*, les souris BALB/c meurent fréquemment lors de l'infection aiguë mais les survivantes présentent peu de kystes cérébraux ; à l'inverse, les souris CBA/Ca ne meurent pas lors de la phase aiguë mais hébergent de nombreux kystes et développent des encéphalites mortelles deux mois après l'infection.

Suzuki Y *et al*-1991-1994 ont démontré que le déterminisme génétique de l'induction de l'encéphalite en phase chronique est en rapport avec un ou plusieurs gènes localisés dans la région H-2D du CMH, les souris portant les allèles b ou k étant susceptibles, celles ayant l'allèle d étant résistantes. Le fait que, contrairement aux souches parentales, les souris hybrides B10.D2-H-2 (dm1) possédant la partie 5' du gène D^d et la partie 3' du gène L^d développent une encéphalite mais moins importante que les souris BALB/c-H-2 (dm2) qui ont une délétion complète du gène L^d prouve que le gène L^d joue un rôle prépondérant dans la résistance à l'encéphalite.

D'après Freund YR *et al*-1992, le polymorphisme transcriptionnel du gène du TNF- α , localisé en 5' de la région H-2D, est corrélé à une résistance contre l'encéphalite. Pourtant l'expérience de Suzuki réalisée chez des souris porteuses du même gène TNF- α (BALB/c et dm2) indique que ce gène n'est pas un facteur déterminant car seules les souris dm2 présentent des zones de nécrose cérébrales.

Le déterminisme génétique n'est pas le seul facteur à intervenir dans l'évolution de la toxoplasmose. D'autres paramètres comme la virulence d'une souche, son mode d'entretien, la taille et la voie d'administration d'un inoculum, influencent directement le déroulement de la maladie. En pratique, une classification en fonction de la virulence chez les souris, fait apparaître deux ensembles différents. Les souches virulentes sont celles qui par injection de moins de 100 tachyzoïtes par voie intrapéritonéale provoque des symptômes aigus conduisant à la mort de la souris dans un délai d'une semaine.

Les souches non virulentes se repèrent par l'absence de symptômes physiques après injection à des doses beaucoup plus élevées, de l'ordre de 10^3 - 10^4 tachyzoïtes ; les souris développant une toxoplasmose chronique avec des kystes intracérébraux.

Le toxoplasme, comme pathogène opportuniste, est un objet de recherche fascinant. L'explosion des connaissances concernant l'immunité anti-toxoplasmique, la physiopathologie et les caractéristiques épidémiologiques du parasite a permis de faire évoluer les approches vaccinales. Nous allons donc maintenant nous intéresser à la fabrication de vaccins et voir qu'elle progresse au rythme des découvertes de l'immunologie et de la biochimie.

LA VACCINATION

La vaccination est l'application la plus remarquable des principes immunologiques à la santé humaine.

Jenner inaugura la vaccination il y a 200 ans dans la prévention de la variole. Ce médecin avait pu observer que les vachères ayant contracté la vaccine (infection des bovidés due à un poxvirus bénigne chez l'homme) n'étaient jamais touchées par la variole. En 1796, il inocula à James Phillips le contenu d'une pustule prélevée chez une servante et montra que le jeune garçon était capable de résister à la variole humaine.

Grâce à Pasteur et à son école (1880 - 1890), la vaccination prend un aspect scientifique. La vaccination (vacca = vache) est un terme que garda Pasteur en l'honneur de Jenner.

I. LES VACCINS

Un vaccin se définit comme une préparation qui, administrée à un sujet, induit une résistance immunitaire spécifique contre un agent infectieux donné. Quatre grands types de vaccins sont disponibles : les vaccins inactivés, les vaccins atténués, les sous-unités vaccinales et les vaccins à ADN.

1. La vaccination par microorganismes tués

Pour supprimer le pouvoir pathogène des microorganismes tout en conservant leur structure antigénique, le plus simple est d'empêcher leur réplication en les tuant d'une manière appropriée. L'immunité induite est souvent de courte durée : il faut donc pratiquer de nombreux rappels et utiliser des adjuvants.

Ce type de vaccins permet d'obtenir des taux satisfaisants d'anticorps circulants mais ne suscite pratiquement aucune réaction immunitaire de type cellulaire : ils sont donc inopérants pour protéger l'organisme contre la toxoplasmose (Krahenbuhl JL *et al*-1972).

2. La vaccination par microorganismes vivants

a. Utilisation de microorganismes vivants atténués

❖ But de l'atténuation

L'atténuation d'un agent pathogène cherche à diminuer sa virulence en conservant les antigènes souhaités. Le microorganisme modifié imite en tout point le comportement naturel du germe, tout en ayant perdu son pouvoir pathogène.

❖ Avantages et inconvénients

Les germes vaccinaux se multiplient dans l'organisme :

- l'hôte est confronté à une dose d'antigènes persistante. De ce fait, une seule immunisation induit une immunité de longue durée.
- la présence de cellules infectées permet le développement d'une réponse T à mémoire.

La majeure partie de la réponse immunitaire se développe au site même de l'infection naturelle. En les administrant par la voie digestive, ils suscitent la production d'IgA sécrétoires.

Les vaccins vivants atténués sont généralement les plus puissants car ils mobilisent tous les mécanismes effecteurs, y compris les cellules T CD8⁺ cytotoxiques.

Ils ont toutefois des inconvénients qui tiennent à leur nature même : les germes introduits peuvent retrouver une partie de leurs propriétés pathogènes et être à l'origine d'accidents redoutables (en particulier chez les immunodéprimés).

La probabilité de réversion vers une forme virulente est cependant très faible lorsque la souche atténuée porte plusieurs mutations.

D'une manière générale, le risque de complications lié à la vaccination doit être comparé à la probabilité de contracter la maladie et aux risques qu'elle fait courir.

❖ Méthode d'atténuation

L'atténuation proprement dite peut être obtenue :

- en modifiant les conditions dans lesquelles le microorganisme se développe. Des séries de mutations apparaissent au hasard, induites par les conditions de culture défavorables. Ce procédé long, aléatoire, est une sorte de roulette génétique.
- en utilisant les techniques de recombinaison de l'ADN. C'est de cette façon que l'on obtient des souches atténuées de virus (le virus de la grippe par exemple). Les possibilités qu'offrent ces techniques ouvrent des champs d'investigation considérables.

b. Utilisation de vecteurs vivants

Une application du génie génétique consiste à insérer les gènes du pathogène dans un vecteur qui, après injection *in vivo*, pourra se répliquer, exprimer le gène et libérer de grandes quantités d'antigènes *in situ*.

On a d'abord envisagé d'utiliser comme vecteur des virus à ADN de grande taille, comme le virus de la vaccine, bien qu'il ne soit pas toujours dénué d'effets secondaires. Cependant, la forte immunité de la population contre ce virus risque de ne pas laisser un temps suffisant pour l'expression des gènes recombinants. Pratiquement tous les virus vivants atténués disponibles ont été proposés comme alternative à la vaccine.

Une autre méthode consiste à utiliser des bactéries atténuées :

- le BCG est un bon candidat car son génome est assez vaste pour accommoder tous les gènes désirés.
- il existe aussi un ensemble de mutants de salmonelles qui peuvent être administrés par voie orale et immuniser les tissus lymphoïdes intestinaux avant d'être éliminés. De tels vaccins permettraient d'induire une immunité intestinale locale, un but essentiel dans le cadre de la toxoplasmose.

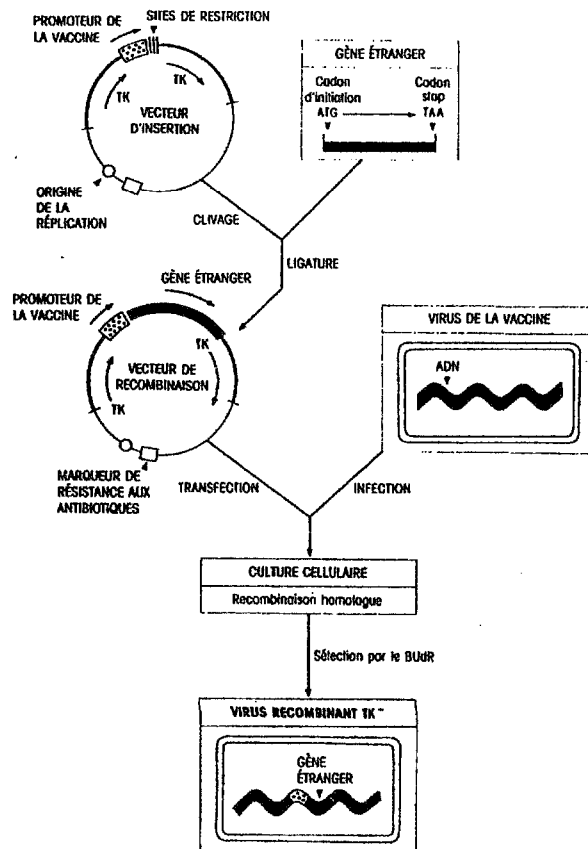


Figure 10 : Construction de virus recombinants

3. Vaccination par antigènes protecteurs isolés

Les extraits antigéniques présentent les désavantages d'être difficilement reproductibles, en terme de production, et d'être constitués de nombreux antigènes dont les effets conjugués peuvent finalement se contrecarrer. Une approche consiste à isoler des antigènes. Cette solution offre, en outre, la possibilité de clonage et d'une production à grande échelle, contrôlée, de protéines antigéniques recombinantes lorsqu'il est impossible de cultiver l'organisme en grande quantité ou trop onéreux d'isoler ses composants immunogènes.

a. Obtention d'antigènes par clonage

Les techniques de recombinaison génétique et l'utilisation d'un vecteur approprié permettent d'obtenir l'expression d'une partie ou l'intégralité d'une chaîne polypeptidique à la demande. Il est très souvent utile d'utiliser le produit du gène seul, afin de pouvoir l'incorporer à un adjuvant.

Le clonage des gènes est un procédé économique dont le champ d'application est vaste.

b. Utilisation de peptides de synthèse

Au niveau du parasite, il est certain que la majorité des déterminants antigéniques protéiques sont discontinus, c'est à dire qu'ils impliquent des acides aminés très éloignés au niveau de la séquence primaire, mais proches les uns des autres dans la structure tertiaire de la protéine. Dans ce cas, les peptides, qui reprennent des séquences linéaires de la structure primaire, ressemblent donc, au mieux, à une partie du déterminant. Ce n'est pas forcément gênant car les fragments peptidiques activent les cellules T dont les TCR reconnaissent plutôt les séquences d'acides aminés que leur conformation, contrairement aux récepteurs des cellules B qui reconnaissent des épitopes conformationnels. Il faut cependant que le peptide soit fixé à une molécule porteuse stimulant les lymphocytes T ou incorporé à un adjuvant pour être immunogène (exemple : couplage avec le muramyl dipeptide).

4. Vaccination ADN

Une nouvelle méthodologie de vaccination appelée vaccination génétique ou vaccination à base d'acides nucléiques a connu un essor considérable ces cinq dernières années.

Après la première génération de vaccins où le matériel est dérivé de la forme vivante ou tuée d'un organisme entier et la seconde génération utilisant des antigènes isolés, la vaccination ADN est considérée comme la troisième génération de vaccins.

Elle fait référence à l'injection *in vivo* d'ADN plasmidiques codant pour une ou plusieurs protéines antigéniques dans le but d'induire une réponse immunitaire spécifique. (Davis HL *et al*-1999)

a. Les techniques de transfert de gènes (Kalinna BH-1997)

Il existe trois façons de faire pénétrer un acide nucléique dans la cellule :

- la micro-injection
- la transfection : méthode non virale
- la transduction : méthode virale

L'ADN dans un solvant aqueux (ADN nu) est inefficace pour la transfection *in vitro* : on a donc recours à des techniques physiques, coprécipitation par du phosphate de calcium et électroporation, ou à des réactifs tels que les lipides cationiques.

De nombreux chercheurs ont étudié les paramètres influençant *in vivo* le transfert de matériel génétique. Les ADN préparés selon des méthodes qui augmentent *in vitro* la transfection (vecteurs rétroviraux recombinants, encapsulation de l'ADN dans des liposomes...), n'ont pas réussi à augmenter *in vivo* le rendement de transfection. Au contraire, un plasmide peut être transfecté dans les fibres musculaires de manière plus efficace qu'un ADN lipide.

Plusieurs voies d'injection (intraveineuse, sous-cutanée, orale, intranasale, intravaginale et même intrasplénique) se sont révélées efficaces mais la voie intramusculaire et la voie intradermique sont les mieux caractérisées. Deux méthodes sont principalement utilisées aujourd'hui :

1/ la première est la simple injection du plasmide dans le muscle. La préparation d'un tel vaccin nécessite le clonage de la molécule cible désirée et son insertion dans le vecteur plasmidique.

2/ l'ADN purifié peut également être injecté par voie intradermique grâce à une sorte de pistolet appelé « gene gun ». Les plasmides, enrobés et séchés sur de très fines particules d'or, sont tirés sous haute pression dans les tissus cibles (épiderme surtout mais également muqueuse orale et vaginale). Grâce à la force du bombardement, les particules pénètrent directement dans les cellules, assurant ainsi un haut degré de transfection (Cheng L *et al*-1993).

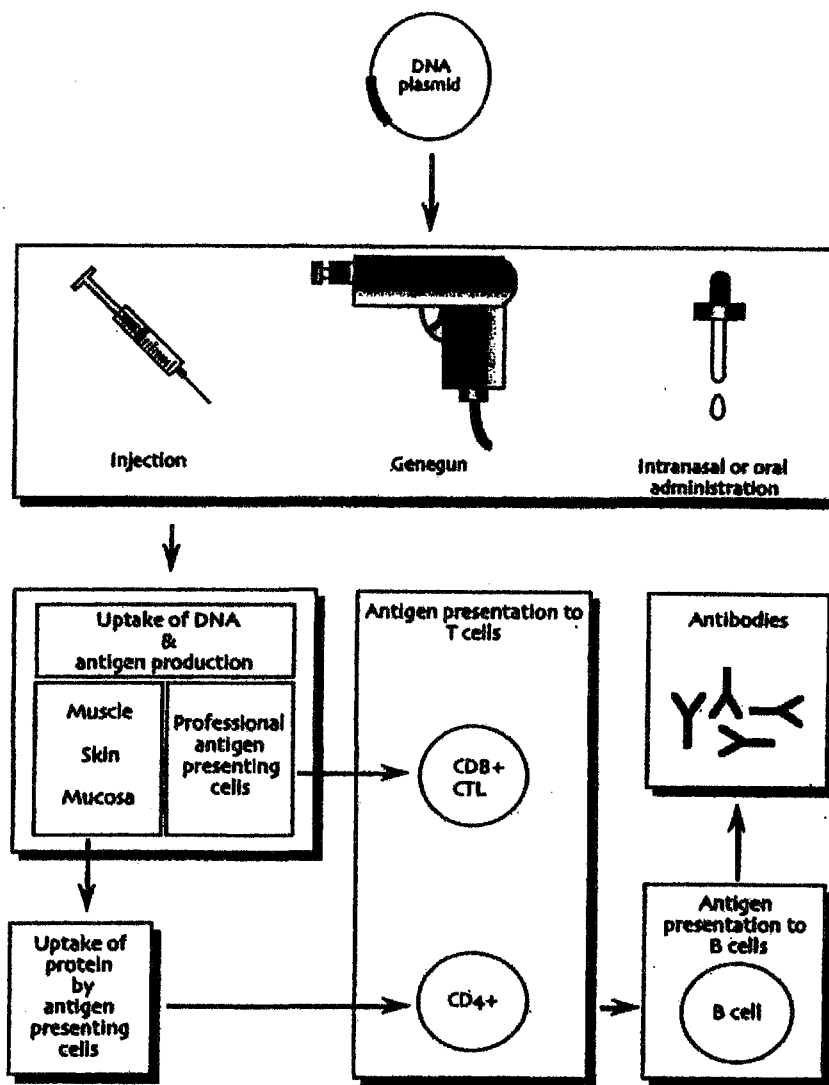


Figure 11 : Le pistolet à gènes

L'ADN, délivré directement dans les cellules de l'organisme à immuniser, s'exprime dans ces cellules (Wolff JA *et al*-1990). Si le plasmide code pour une protéine, cette dernière est présentée sous forme native au système immunitaire et stimule de manière efficace les réponses immunes (Tang D *et al*-1992).

b. La composition des vaccins ADN

L'ADN utilisé comme immunogène consiste en un plasmide bactérien contenant à la fois des séquences procaryotes nécessaires à sa propagation dans les bactéries et des séquences eucaryotes nécessaires à l'expression, chez l'animal *in vivo*, des gènes codant pour les antigènes d'intérêt.

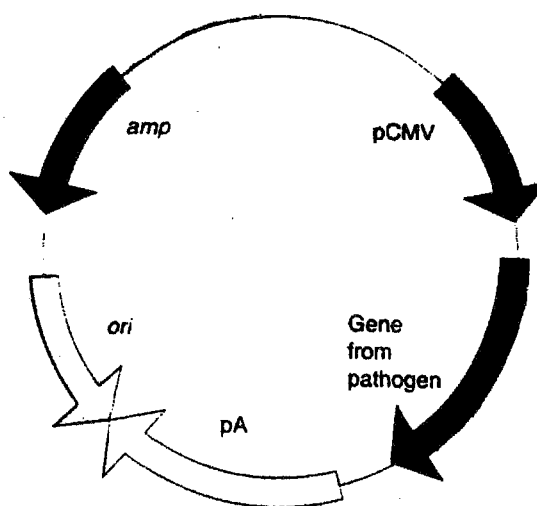


Figure 12 : Composition d'un plasmide

Pour une transfection réussie, le plasmide doit posséder (Simmonds RS *et al*-1997) :

- un élément terminal dérivé du gène de l'hormone de croissance bovine responsable d'une polyadénylation « pA » (le rôle de la région terminale 3'poly A est de stabiliser les ARNm),
- une amorce de réplication d'origine bactérienne « ori »,
- un gène marqueur : gène de résistance à un antibiotique « amp » (le gène de résistance à la kanamycine est préféré chez l'homme à celui de l'ampicilline),
- la séquence codante,
- les éléments de régulation de la transcription : promoteur et séquences d'élongation (c'est le promoteur du CMV « pCMV » qui est le plus utilisé),
- des éléments optionnels comme des épitopes Th, des séquences immunostimulantes CpG et des gènes codant pour des cytokines ou des molécules de costimulation.

c. Mécanismes d'activation du système immunitaire par les vaccins ADN

❖ Induction de la réponse immune (Waine GJ *et al*-1995)

- Après synthèse, les protéines sont transportées dans la lumière du réticulum endoplasmique où elles sont assemblées aux molécules de classe I du CMH. Les complexes gagnent ensuite la surface cellulaire et sont présentés aux lymphocytes T CD8+.

- Une petite quantité de protéines est libérée continuellement à partir des cellules transfectées et lors de la lyse cellulaire. Ces protéines extracellulaires sont endocytées par les CPA puis assemblées avec les chaînes α et β des molécules de classe II du CMH. Après translocation à la surface cellulaire, les complexes sont la cible des CD4+ Th qui apportent une aide à la production d'anticorps.

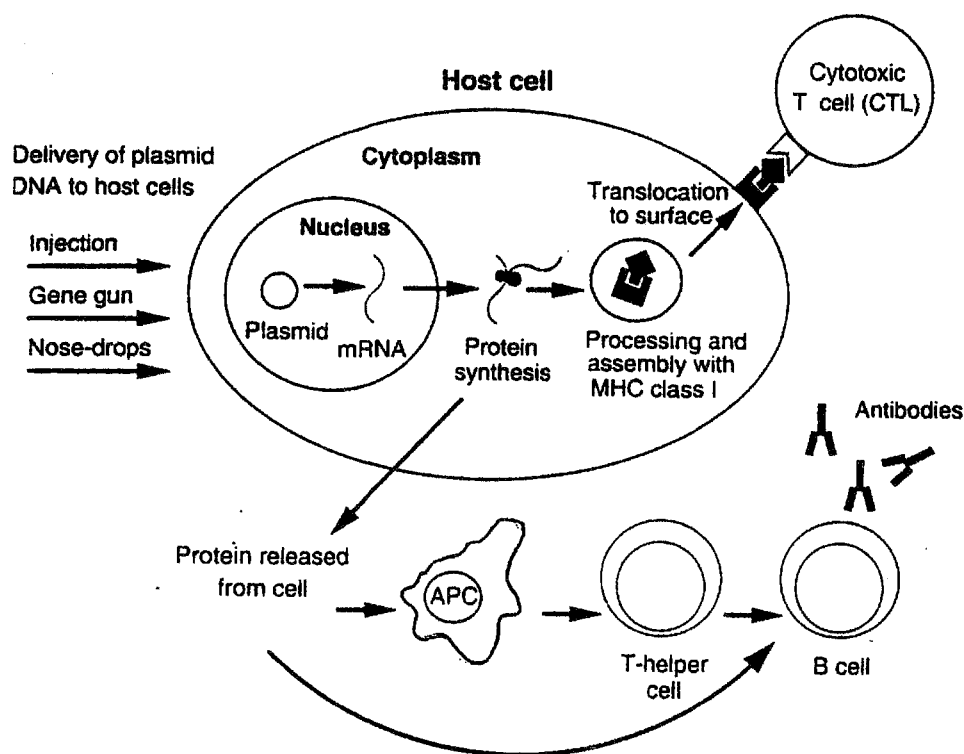


Figure 13 : Induction de la réponse immunitaire par les vaccins ADN

❖ Présentation antigénique

Dans ces plus simples applications, la vaccination nécessite l'expression de l'antigène dans des tissus accessibles tels que le muscle ou la peau. Au début, on pensait que seules les cellules au point d'injection, cellules musculaires ou kératinocytes selon le mode d'injection, servaient à la production de l'antigène. Celui-ci, après sécrétion ou relargage par les cellules transfectées, pouvait être capturé par les cellules présentatrices d'antigènes environnantes, les seules à pouvoir initier la réponse T après migration dans les ganglions.

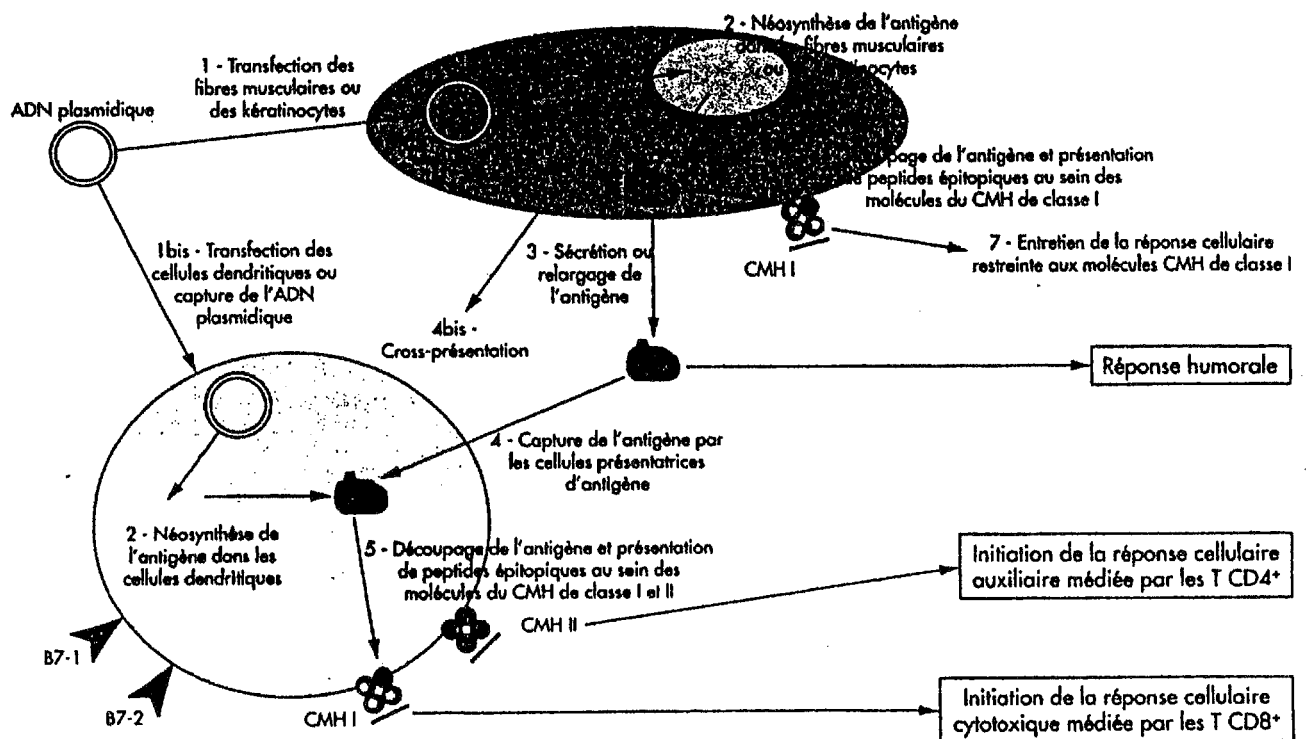


Figure 14 : Rôle des CPA

On s'est aperçu récemment que les seules cellules indispensables sont les CPA dérivées de la moelle. Des expériences montrent que la réponse immunitaire peut se développer et persister même après ablation du muscle, dix minutes seulement après l'injection d'ADN, suggérant que celui-ci est immédiatement transporté hors du site d'injection. Ces expériences ont été confirmées par la mise en évidence dans les cellules dendritiques purifiées à partir de ganglions, d'ADN, de produits de transcription de cet ADN et même de peptides antigéniques (Casares S *et al*-1997).

Il suffit donc d'un faible nombre de CPA transfectées pour obtenir la présentation de l'antigène par les molécules de classe I et II et pour induire une réponse cellulaire complète. Néanmoins, le mécanisme de transfert d'antigènes ou de fragments peptidiques des cellules non hématopoïétiques transfectées vers les cellules dendritiques résidentes connu sous le nom de « cross presentation » reste possible comme l'ont suggéré les expériences de transfert *in vivo* de myocytes transfectés *in vitro* (Ulmer JB *et al*-1996). De plus, les kératinocytes ou les myocytes transfectés semblent indispensables comme source d'antigène natif pour la stimulation de la réponse humorale ; même s'il y a transfection directe des cellules de Langherhans de la peau, ces cellules n'atteignent pas tout de suite les tissus lymphatiques : la suppression de la peau dans les jours qui suivent le transfert abroge les réponses immunes.

❖ Maintenance des réponses

La vaccination génétique induit des réponses humorales et cellulaires remarquablement persistantes.

L'immunisation génétique fournirait un réservoir intracellulaire d'antigènes qui ne serait pas sensible aux anticorps ni aux CTL. Une production constante d'antigènes à bas niveau pourrait stimuler le système immunitaire et dispenser d'injections de rappel. Néanmoins, pour certains antigènes on a constaté une destruction, par la réponse cellulaire cytotoxique, des fibres musculaires transfectées (Davis HL *et al*-1997). Dans ce cas, le muscle ne serait donc pas requis comme source d'antigène pour la persistance de la réponse : celui-ci pourrait être stocké sous forme de complexes immuns au sein des cellules folliculaires dendritiques présentes dans les ganglions lymphatiques. La longévité de la réponse pourrait être due, d'autre part, à l'induction efficace et à l'expansion d'un pool de lymphocytes T précurseurs suffisants pour alimenter une réponse à long terme (Akbari O *et al*-1999).

❖ Séquences d'ADN immunostimulatrices

Comment les vaccins à base d'ADN peuvent-ils avoir un si fort potentiel immunogène alors qu'ils permettent la synthèse de quantités si infimes d'antigènes et que l'ablation des tissus transfectés peu de temps après injection n'altère pas la réponse immune ?

Une réponse à cette question a été apportée, comme souvent en biologie, par des expériences contrôles utilisant des plasmides vides ou codant pour des antigènes contrôles. Les séquences d'origine bactérienne contenues dans l'ossature plasmidique contiennent un nombre élevé de motifs palindromiques : purine-purine-CG-pyrimidine-pyrimidine ou motif CpG. Les chercheurs savaient, par des expériences plus anciennes réalisées avec des séquences dérivées de *Mycobacterium*, que ces motifs possèdent un effet stimulateur de l'immunité innée en activant les cellules NK et la production d'interféron- γ . Ces motifs CpG ou séquences immunostimulatrices sont présents à une fréquence de 1/16 bases dans l'ADN procaryote et seulement 1/50 dans l'ADN eucaryote, chez lequel les cytosines de ces motifs sont fréquemment méthylées.

On peut donc diviser les vaccins à base d'ADN en deux composants distincts : une unité de transcription eucaryote permettant la synthèse de l'antigène et une partie adjuvante constituée par l'ossature du plasmide bactérien. Au cours de ces dernières années, les données expérimentales se sont accumulées sur ces séquences CpG et l'on sait maintenant qu'elles sont responsables de l'activation de l'immunité innée, sorte de système de surveillance primaire donnant l'alerte à la moindre reconnaissance de séquences étrangères (procaryotes). Ces séquences que l'on peut mimer par des oligonucléotides synthétiques ont un effet mitogène sur les cellules B, augmentent la production d'immunoglobulines et d'IL-6 par les cellules B, activent les CPA pour la sécrétion des cytokines IFN- γ et IL-12 et les cellules NK par le biais de l'IFN- γ .

L'activation due à ces séquences CpG crée un environnement en cytokines favorable au développement, en présence de l'antigène, d'une réponse Th1 favorisant ensuite la persistance de la réponse spécifique.

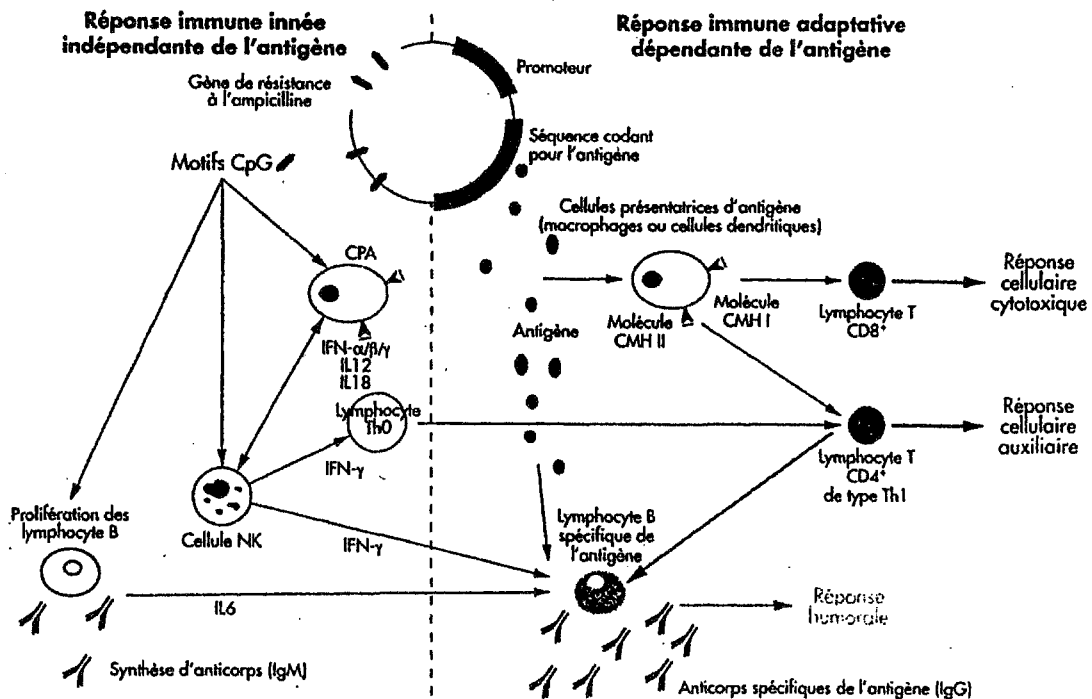


Figure 15 : Les motifs CpG augmentent la réponse innée

d. Avantages de l'injection d'ADN

Un des plus grands attraits des vaccins ADN est qu'ils stimulent à la fois la réponse humorale et la réponse à médiation cellulaire (Rhodes GH *et al*-1993). L'induction des lymphocytes T cytotoxiques, due à la néosynthèse *in vivo* des antigènes, confère aux vaccins à base d'ADN l'efficacité des vaccins vivants atténués sans toutefois présenter les risques d'infection ou de réversion. La persistance de l'expression des antigènes *in vivo* induit une immunité de longue durée et dispense d'injections de rappel. Parmi les autres avantages, on peut citer la stabilité des vaccins à la chaleur rendant inutile la chaîne du froid, leur coût très faible et la facilité à purifier ce type de molécule avec un protocole de préparation unique applicable à tous les vaccins.

e. Problèmes de sécurité liés à l'injection d'ADN

❖ Intégration

La possibilité théorique d'intégration chromosomique de l'ADN plasmidique est le principal problème de sécurité soulevé par l'injection d'ADN chez l'homme. Cette intégration pourrait bousculer l'équipement du génome au voisinage du site d'insertion, activer un oncogène, désactiver un gène suppresseur de tumeur ou un gène de régulation, conduisant à une altération du contrôle de la division cellulaire et créant ainsi une lésion néoplasique. Les premières études sur la capture de l'ADN dans le muscle de souris avaient montré que cet ADN persistait sous forme circulaire, non intégrée. Des études plus récentes utilisant la PCR ont montré que l'ADN injecté était rapidement éliminé des tissus autres que ceux directement ciblés (muscle, peau). De plus, aucune forme intégrée n'a été retrouvée avec une sensibilité de détection de 1-7,5 plasmides/150000 noyaux, ce qui est largement en dessous de la fréquence des mutations spontanées dans l'ADN génomique (Nichols WW *et al*-1995).

❖ Anticorps anti-ADN

Ces anticorps pourraient être potentiellement responsables de pathologies auto-immunes du types lupus érythémateux chez des individus prédisposés. De tels anticorps n'ont pas été retrouvés chez des animaux hyperimmunisés avec de l'ADN, ni chez l'homme après injection d'ADN (MacGregor RR *et al*-1998).

❖ Tolérance

La persistance à long terme de l'antigène produit par le plasmide injecté, pouvait laisser craindre l'établissement d'une tolérance immunitaire à cet antigène. Mais, dans certains modèles, il a été démontré que la production de l'antigène était auto-limitée par la réponse cytotoxique, restreignant ainsi cette possibilité. D'autre part, des injections successives d'ADN codant pour l'antigène induisent un effet rappel patent sur la réponse anticorps, indiquant qu'une tolérance n'a pas été induite (Davis HL *et al*-1999).

II. LES ADJUVANTS

Une immunisation active doit avoir des effets de longue durée, et doit être obtenue avec un nombre minimal d'injections. L'intensité de la réponse immunitaire peut être augmentée lorsque certaines substances, les adjuvants, sont injectées en même temps que l'antigène. Ces substances sont indispensables pour la confection de vaccins faits de peptides, de protéines ou de microorganismes tués.

1. Les adjuvants « classiques »

Ils agissent par plusieurs mécanismes :

a. Effet de dépôt

L'antigène libre se disperse en général rapidement dans les tissus entourant le site d'injection. Une fonction importante de certains adjuvants est d'empêcher cette dispersion en constituant un réservoir durable d'antigènes, situé soit dans un site extracellulaire, soit à l'intérieur des macrophages.

b. Activation des macrophages

Sous l'influence des adjuvants de dépôt, les macrophages forment des granulomes qui constituent des lieux d'interactions cellulaires.

Pratiquement tous les adjuvants stimulent les macrophages. Les macrophages activés améliorent l'immunogénicité par une augmentation de la quantité d'antigènes à leur surface, une meilleure présentation antigénique et une sécrétion de cytokines stimulant la prolifération lymphocytaire.

c. Nouvelles techniques d'inoculation des antigènes

- On s'est récemment intéressé à l'utilisation de petites vésicules à membranes lipidiques, les liposomes, pour présenter l'antigène au système immunitaire.

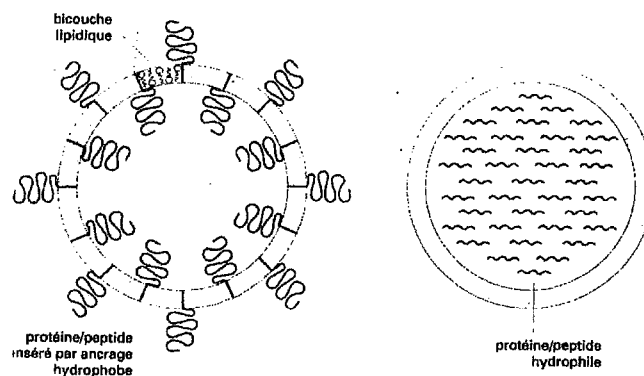


Figure 16 : Transport de protéines par les liposomes

L'une des caractéristiques majeures des liposomes est leur tropisme marqué pour le système réticulo-endothélial : on a avancé l'hypothèse qu'ils fusionnent avec la membrane des macrophages, permettant ainsi la formation d'un complexe particulièrement immunogène ; ils pourraient également jouer le rôle de vacuoles de stockage à l'intérieur des macrophages.

- L'ISCOM (COMplexe ImmunoStimulant) est une autre innovation : c'est une matrice constituée de sous-unités de 10-12 nm de Quil A et de cholestérol. En présence de phospholipides, ces sous-unités s'assemblent et forment des espèces de cages sphériques d'un diamètre de 30-40 nm dans lesquelles des protéines peuvent être introduites.

Les ISCOMs induisent des réponses immunes caractérisées par la production de cytokines associées au modèle Th1 telles que IL-2 et IFN- γ . Ils possèdent également la capacité d'activer les cellules T cytotoxiques et helper (Morein *et al*-1995), augmentent la prise en charge et l'internalisation des antigènes, amplifient l'expression du CMH et la présentation cellulaire.

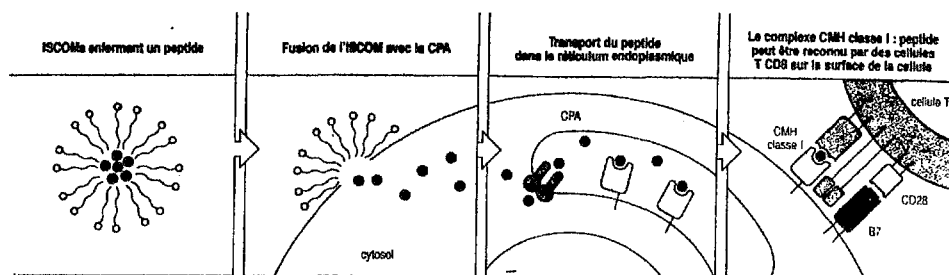


Figure 17 : Transport de peptides par des ISCOMs

2. Les accessoires de la vaccination ADN

a. Les cytokines

La nature des cytokines utilisées pour améliorer la vaccination est variée. Un plasmide codant pour l'IL-2 a été utilisé avec succès pour augmenter la réponse anticorps et la réponse proliférative subséquentes à l'injection d'un vaccin ADN anti-HBV. La coadministration d'un vecteur codant pour l'IL-12 permet généralement une augmentation importante de la réponse T cytotoxique spécifique. L'utilisation du plasmide pGM-CSF a permis d'amplifier les réponses immunes lors d'une vaccination ADN anti-malaria et explique l'emploi de cet adjuvant dans le cas de la toxoplasmose. Il faut cependant garder à l'esprit que les cytokines sont à manipuler avec prudence, leur action pouvant s'avérer catastrophique pour un antigène dérivé d'un autre pathogène.

b. Les molécules de co-stimulation

On observe un renforcement de la réponse cellulaire spécifique lors de l'administration de séquences codant pour CD86, soit par co-injection de vecteurs soit par co-expression avec l'antigène.

c. Les molécules de ciblage

Les séquences codant pour l'antigène peuvent être fusionnées à des séquences favorisant la dégradation de la protéine dans les protéasomes ou augmentant la présentation de l'antigène par les molécules de classe I du CMH (Tobery TW *et al*-1997).

III. DIFFICULTES LORS DE LA MISE AU POINT DE VACCINS

Tous les parasites qui ont survécu après des millions d'années d'interactions avec leurs hôtes, ont développé de multiples mécanismes d'adaptation. Les phénomènes d'échappement du toxoplasme aux réponses immunitaires posent d'importantes contraintes lors de l'élaboration de vaccins.

1. La séquestration anatomique

Les parasites vont se protéger contre les défenses de l'hôte par leur inaccessibilité :

- la localisation intracellulaire dans des cellules incapables de se défendre ou l'enkystement dans certains sites anatomiques permettent au toxoplasme d'échapper aux effecteurs de l'hôte.
- la barrière hémato-méningée limite le flux des cellules immunocompétentes, des médiateurs, de l'IFN- γ et des anticorps : les bradyzoïtes s'établissent principalement au niveau du cerveau.

2. La résistance aux mécanismes effecteurs

a. Résistance au complément

Les toxoplasmes ont une surface qui n'active pas la voie alterne du complément.

b. Résistance à la lyse intracellulaire

Les tachyzoïtes recouverts d'anticorps sont phagocytés par les macrophages. Les phagosomes migrent dans le cytoplasme, activent les mécanismes lytiques dépendant de l'oxygène et fusionnent avec les lysosomes pour former un phagolysosome. L'acidification du phagosome joue un rôle important dans la destruction du parasite.

T. gondii peut échapper à ce processus en pénétrant activement dans la cellule par des voies n'activant pas la réaction oxydative. Il est également capable d'inhiber la fusion avec les lysosomes et d'empêcher l'acidification.

3. Echappement à la reconnaissance

La multiplication intracellulaire des toxoplasmes, notamment dans le macrophage sans qu'intervienne la phagocytose, permet la dissémination du parasite dans tout l'organisme par voie sanguine et lymphatique à l'abri de l'effet lytique des anticorps.

Parce qu'il ne fusionne avec aucune vésicule cellulaire, le protozoaire peut créer sa propre vésicule pour s'isoler du reste de la cellule. Ce phénomène permet à *T. gondii* d'éviter que des peptides dérivés de ses protéines ne soient disponibles pour se loger sur les molécules de CMH, et dès lors, de rester invisible pour le système immunitaire.

4. La modification des antigènes de surface

- De nombreuses molécules sont exprimées aux différents stades de *T. gondii*. L'existence de molécules spécifiques de stade a été prouvée par l'utilisation d'anticorps monoclonaux. C'est ainsi que sont actuellement décrites des molécules du stade sporozoïte (P25 et P67), du stade bradyzoïte (P18, P21, P34, P36) et du stade tachyzoïte (P30, P22 et P35).

- Pour un même stade parasitaire, des variations entre souches de *T. gondii* ont été décrites à partir du pouvoir pathogène expérimental.

L'expression variable de P22 et les différences dans la structure de P30 seraient corrélées à la virulence du parasite. La séquence complète du gène de la protéine SAG1 issue de la souche RH a été publiée par Burg JL *et al*-1988. La comparaison de cette séquence avec celle de la souche C révèle que seulement 14 nucléotides diffèrent, les 8 à 10 changements dans la séquence codante se situant dans la moitié C terminale. La souche P et C ne montrent qu'une seule substitution en position 46 (guanine chez P à la place d'alanine chez C). Du fait de cette grande conservation, la plupart des anticorps anti-P30 reconnaissent les 3 souches (Bülow R *et al*-1991).

L'institut Pasteur de Bruxelles a recherché s'il existait un polymorphisme d'expression des protéines GRA en relation avec la virulence des souches. L'analyse d'une vingtaine d'isolats a révélé un polymorphisme des protéines GRA5 et GRA6 en fonction du type de souches. Afin de savoir si la différence de taille était due à la structure primaire des protéines, les chercheurs ont cloné par PCR et séquencé les fragments génomiques contenant les gènes GRA5 et GRA6 de deux souches de chacun des trois types. La comparaison des séquences en acides aminés montre un faible polymorphisme génétique entre les souches A et B (1%) et, bien que les protéines de type B aient une taille supérieure à celles de type A, les cadres de lecture codent pour des protéines légèrement plus courtes dans leur région C-terminale.

Les variations entre les souches ne poseraient donc aucun problème dans le développement d'un vaccin.

5. Altération des défenses de l'hôte

a. Immunosuppression chez la souris

La prolifération des splénocytes en réponse aux mitogènes et aux lysats de toxoplasmes (TLA) est supprimée durant la phase aiguë (Chan J *et al*-1986 ; Khan IA *et al*-1996).

Une immunosuppression transitoire est bénéfique car elle permet au parasite de s'établir chez l'hôte : les réponses lymphocytaires des souris résistantes BALB/c sont normales à J68. Par contre, si cette suppression persiste en phase chronique, comme c'est le cas des souris CBA/Ca, elle induit une pathologie sévère. Une encéphalite toxoplasmique est responsable du taux élevé de mortalité constaté 2 mois après l'infection. Les macrophages péritonéaux de ces souris produisent plus de RNI (reactive nitrogen intermediates) que ceux des BALB/c dans la phase aiguë mais la différence est encore plus marquée dans la phase chronique (Candolfi E *et al*-1994).

❖ **Implication des RNI** (Candolfi E *et al*-1995 ; Nam HW *et al*-1995)

- La suppression maximale des réponses lymphocytaires, observée entre J7-J14, est corrélée avec le pic de production de nitrites.
- La déplétion en cellules adhérentes d'une préparation splénique issue de souris en phase aiguë de toxoplasmose suivie de l'addition de cellules adhérentes de souris non infectées se solde par une augmentation de la prolifération des cellules spléniques et d'une diminution des nitrites dans le milieu de culture.
- Un Anticorps anti-IFN- γ , en diminuant la production de nitrites, restaure la prolifération ; l'effet est inversement proportionnel à la quantité d'anticorps utilisée.
- L'addition de NMMA restaure partiellement la prolifération en réponse à la concanavaline A (ConA) et aux TLA.

Il est important de souligner que l'ajout de NMMA n'augmente les réponses prolifératives que dans les 3 premières semaines de l'infection. A J63, malgré la présence de NMMA dans le milieu de culture des splénocytes des souris CBA, l'inhibition reste encore de 41.9% ; le niveau de RNI est élevé par rapport au groupe contrôle mais reste bas comparé à celui de J7. Ces résultats suggèrent que des facteurs autres que les RNI sont impliqués dans la suppression chez les CBA.

❖ IL-10 (Khan IA *et al*-1995)

Les propriétés suppressives de l'IL-10 ne sont apparentes, *in vitro*, qu'après traitement visant à supprimer l'effet des RNI (anticorps anti-IFN- γ ou NMMA). Ceci explique que l'action d'un anticorps anti-IL-10 ne se fait ressentir, *in vivo*, qu'à partir de J14, moment où l'effet des RNI s'estompe. Cet anticorps augmente de 4 fois la prolifération des splénocytes mais ne réduit pas la production de nitrites de souris infectées. L'activité immunosuppressive de l'IL-10 est donc indépendante des RNI.

❖ IL-2

Le rôle de l'IL-2 a été étudié par Sakhina Haque *et al*.

- en 1994 : les splénocytes des souris infectées par le mutant PTgB, déficient en SAG1, montrent une diminution de la prolifération mais nettement moins marquée que lorsqu'on utilise la souche sauvage PTg. Les surnageants des cultures contiennent significativement moins d'IL-2. L'administration d'IL-2 n'a pourtant pas permis de restaurer les réponses prolifératives des souris A/J infectées par la souche PTg.

- l'année suivante, les chercheurs ont constaté que les macrophages de souris infectées réduisent la réponse proliférative de lymphocytes issus de souris non infectées en affectant la réponse IL-2 et en diminuant le nombre des récepteurs pour cette cytokine, l'affinité des récepteurs, estimée par la valeur du KD, restant inchangée. L'inhibition de la production d'IL-2 est variable et dépend du nombre de tachyzoïtes utilisés pour infecter les macrophages.

Le mécanisme de la diminution de IL-2 est multifactoriel mais passe certainement par l'action de l'IL-10.

❖ **Intervention du calcium** (Haque S *et al*-1998)

Le signal lié au calcium est essentiel pour la croissance et la différenciation des cellules du système immunitaire. La liaison d'un anticorps au complexe CD3 des lymphocytes T imite l'activation via le récepteur de l'antigène : il y a production d'inositol 1,4,5-triphosphate, une augmentation du calcium ionisé intracellulaire et une prolifération lymphocytaire.

L'augmentation du calcium active la calcineurine (sérine/thréonine phosphatase sensible à la ciclosporine A) qui déphosphoryle le NF-AT. Une fois déphosphorylé, le facteur migre dans le noyau où il provoque la transcription de gènes régulateurs de la réponse immune. De hautes concentrations en Ca^{++} sont nécessaires pour maintenir le NF-AT dans le noyau.

Durant la phase aiguë de toxoplasmose, le métabolisme calcique est perturbé : la mobilisation du calcium est fortement diminuée (50-53% de réduction dans la réponse $[\text{Ca}^{++}]_i$ après stimulation par des anticorps anti-CD3 ou des mitogènes).

Le flux de Ca^{++} est insuffisant pour provoquer le transfert du NF-AT dans le noyau. Les conséquences sont nombreuses mais une des perturbations majeures est la diminution de la transcription de l'IL-2.

Le défaut dans le signal Ca^{++} chez les cellules T stimulées peut interférer sur d'autres facteurs de transcription : NF-kB JNK ... nécessaires à l'activation et à la prolifération des lymphocytes.

b. Immunosuppression chez l'homme (Channon JY et Kasper LH-1996)

La suppression des fonctions lymphocytaires est présente et limite les dommages tissulaires liés à une réponse immune excessive. Les mécanismes sous-jacents ne sont connus que très vaguement :

- le phénomène d'apoptose n'intervient pas car le nombre et la viabilité des cellules (lymphocytes et CPA) sont identiques au groupe témoin.
- l'hypothèse retenue est la libération de facteur(s) soluble(s) (FS).

Le pic de FS a lieu entre 4 et 24h après l'infection.

Il est dépendant du contact macrophage-tachyzoïtes vivants. La libération maximale est corrélée à une pénétration active et est indépendante de la réplication du parasite. L'interaction ligand-récepteur reste à définir. On sait qu'elle ne dépend ni de la laminine ni de SAG1. Le stimulus est très puissant car 20 macrophages et un seul tachyzoïte suffisent pour inhiber de 50% la synthèse d'ADN par les lymphocytes.

Une corrélation est retrouvée entre les cinétiques de libération de FS, d'IFN- γ et de PGE2. Le rôle de la PGE2 est exclu car l'indométacine n'a pas de répercussion sur l'inhibition. Par contre, un anticorps anti-IFN- γ diminue de 37% la synthèse d'ADN par les lymphocytes. Plus de 50% de la suppression est donc attribuée à un mécanisme dépendant de l'IFN- γ .

La libération de FS est précoce mais l'effet inhibiteur n'apparaît qu'entre j30 et 54. C'est donc un processus en 2 étapes qui se met en place. L'IFN- γ est le principal composant des FS. Les autres médiateurs, IL-10, NO, TGF- β , PGE2 et dérivés oxygénés ne sont pas incriminés chez l'homme.

c. Activité superantigène

❖ Définition

Les superantigènes sAg sont classés dans une catégorie distincte des antigènes dits normaux car ils ont un mode de liaison différent, leur permettant de stimuler un très grand nombre de cellules T. Au lieu de se lier dans la fente de la molécule du CMH, ils se lient directement aux molécules du CMH sans devoir être préalablement traités (la fragmentation d'un sAg lui enlève son activité biologique). Les sAg peuvent donc se fixer, de manière indépendante, à la fois sur les surfaces externes de la molécule du CMH de classe II et sur la région V β du récepteur de la cellule T. De ce fait, toutes les cellules T possédant la chaîne V β en question sont activées. Ce mode de stimulation n'est donc pas spécifique du pathogène et ne conduit pas à une immunité adaptative. Au contraire, elle provoque une production massive de cytokines par les CD4⁺ qui représentent la population majoritairement répondeuse. Cette libération de cytokines a souvent des conséquences désastreuses et peut conduire soit à une toxicité systémique soit à une suppression des réponses adaptatives. Les détails de cette

suppression ne sont pas bien compris. Les cellules stimulées prolifèrent et ensuite disparaissent rapidement, apparemment parce qu'elles subissent une apoptose, laissant un état de suppression généralisée dû à une délétion périphérique de nombreuses cellules T.

❖ Application à *T. gondii*

Bien que les superantigènes (sAg) soient produits par un grand nombre de pathogènes différents, les seuls décrits jusqu'à présent étaient d'origine virale ou bactérienne. Récemment, plusieurs chercheurs indépendants ont mis en évidence une activité sAg associée à *T. gondii*. L'hypothèse évoquant une activité due à un contaminant externe a été rapidement abandonnée et celle impliquant un virus hébergé par le parasite ne peut pas être vérifiée compte tenu des connaissances limitées en ce domaine.

Cette activité est présente aussi bien dans les préparations d'antigènes solubles que dans celles contenant des tachyzoïtes entiers issus de fibroblastes humains cultivés *in vitro* ou prélevés au niveau du péritoine de souris infectées.

In vitro, les splénocytes mis en contact avec le sAg, prolifèrent rapidement et libèrent ensuite des quantités massives d'IFN- γ .

L'expansion touche essentiellement les cellules T V β 5⁺ et plus particulièrement les CD8⁺V β 5, qui après sept jours de culture, représentent plus de 70% des cellules totales. Ceci contraste avec la population splénocytaire normale qui est composée d'environ 14% de CD8⁺ dont 12 à 13 % expriment le V β 5.

Les CD4⁺ qui normalement ne persistent pas en culture, prolifèrent de 2-3 à 5-6%, l'augmentation concernant là encore les V β 5.

La population lymphocytaire V β 5 a été examinée *ex vivo* en utilisant des souris en phase aiguë ou chronique d'infection par la souche ME49 :

- les cellules portant le V β 5 sont augmentées de 1.5 fois en phase aiguë et diminuée de 20% en phase chronique.
- les splénocytes des souris en phase chronique ne prolifèrent pas lorsqu'ils sont stimulés avec des tachyzoïtes ou avec un anticorps anti-V β 5. Leur production d'IFN- γ est abolie.

Les cellules V β 5+ deviennent non-répondeuses lors de l'évolution de la toxoplasmose en phase chronique. L'infection par *T. gondii* induit donc un statut d'anergie dans la population V β 5.

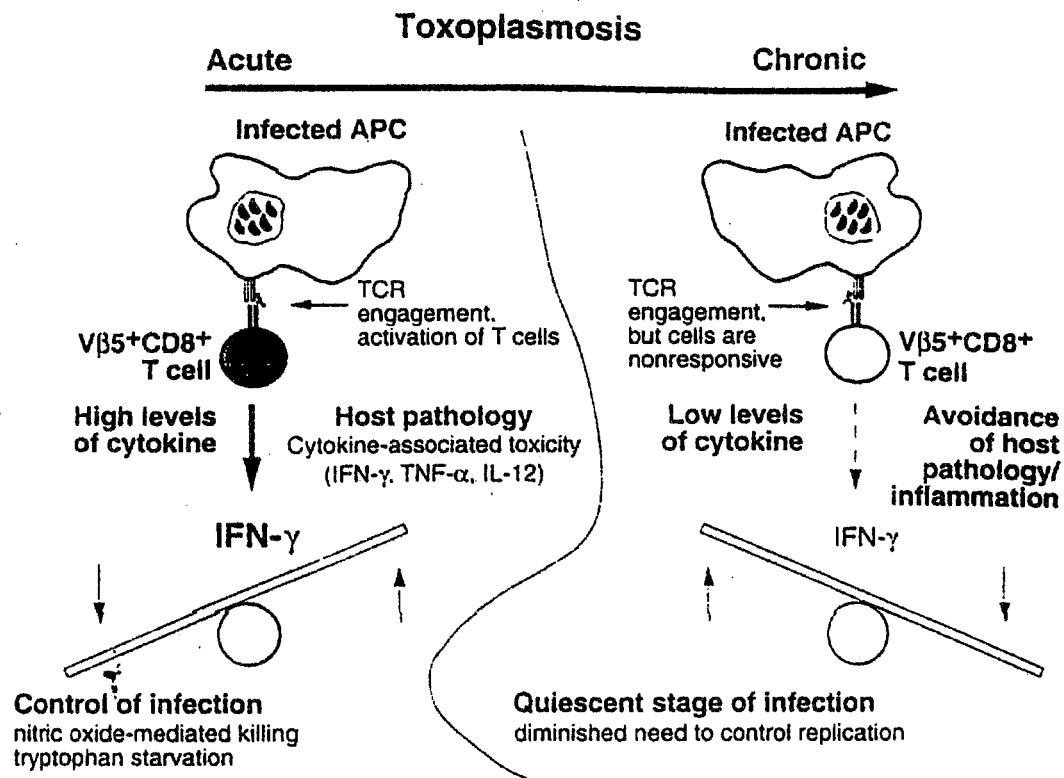


Figure 18 : Evolution de la toxoplasmose

Des sAg tels que l'entérotoxine du staphylocoque ont déjà été incriminés dans l'inactivation des lymphocytes portant l'élément réactif V β mais c'est la première démonstration d'une anergie V β spécifique induite par un protozoaire. Ce phénomène évite un choc toxique potentiellement mortel pour l'hôte et le parasite.

IV. LES CANDIDATS VACCINS

Après marquage métabolique du parasite, l'électrophorèse bidimensionnelle a permis d'observer plus d'un millier de molécules. Ces molécules appartiennent à deux grandes catégories :

- les antigènes somatiques, qui peuvent être préparés à partir du parasite à l'un quelconque de ses stades évolutifs. Parmi ceux-ci, on doit distinguer les antigènes solubles, extraits des parasites par différents procédés, et les antigènes figurés, constitués par des fragments parasitaires ou par des parasites entiers, vivants ou non. Ces antigènes figurés ont différents avantages pratiques, notamment parce que leur obtention est simple, évitant toutes les difficultés qu'entraînent l'extraction et la purification des antigènes solubles. Sous un angle plus fondamental, ces antigènes figurés permettent des réactions sérologiques face aux antigènes de surface. Situés directement au contact de l'hôte, ces derniers antigènes jouent un rôle primordial dans la réponse immunologique. Ils sont à cet égard très supérieurs aux antigènes intraparasitaires qui prédominent dans les extraits solubles.

- les ESA : antigènes excrétés-sécrétés (antigènes métaboliques ou exoantigènes), libérés par le parasite dans certaines formations (vacuole parasitophore) ou bien dans le surnageant de milieux de culture *in vitro*. Ces antigènes proviennent pour une grande majorité des granules denses et pour une faible proportion de la surface des parasites (Cesbron-Delauw *et al*-1993).

1. Choix des composants

Les composants immunogéniques peuvent être identifiés par deux méthodes différentes.

1/ La première stratégie est de sélectionner les molécules cibles de la réponse immune chez les animaux chroniquement infectés.

Exemple n°1 : peptides de ROP2 (Saavedra R *et al*-1996)

Pour identifier les épitopes reconnus par les cellules T humaines, les auteurs ont sélectionné 3 épitopes T potentiels prédits par les algorithmes : séquences 197-216, 393-410 et 501-524. Les peptides correspondants ont été synthétisés et ont subi des tests de prolifération vis à vis de clones humains spécifiques de ROP2. Le 1^{er} peptide stimule tous les clones de cellules T.

Les trois peptides ont ensuite été testés pour leur capacité à faire proliférer les PBMC issues d'un panel de donneurs séropositifs et séronégatifs. 64% des donneurs séropositifs pour la toxoplasmose reconnaissent au moins un des 3 épitopes. Le peptide 197-216 est le plus reconnu : 45% des cellules sont stimulées. La réponse au peptide 501-524 n'est que de 36%. Aucun des donneurs séronégatif ne réagit avec l'un des 3 peptides.

Exemple n°2 : peptides de SAG1

La molécule SAG1 a été analysée par Nielsen HV *et al*-1999. La carte des épitopes a mis en évidence 4 épitopes CTL potentiels et les chercheurs, en évaluant les réponses de type CD8+ dans un essai ELISPOT chez des souris immunisées avec un plasmide p1tPASAG1, ont réussi à identifier un nouvel épitope.

2/ La seconde, basée sur un protocole d'immunisation active, permet de dévoiler les molécules qui ne sont pas naturellement reconnues par la réponse immune contre l'infection mais qui peuvent être des candidats vaccins potentiels.

La localisation des molécules au sein du parasite est un critère de choix important : la plupart des molécules candidates sont à priori des molécules accessibles au système immunitaire, à la surface du tachyzoïte.

On se fonde également sur le rôle présumé des molécules, soit dans le processus d'invasion ou de motilité, soit dans la formation de la vacuole parasitophore.

Ainsi on a déduit que les principaux antigènes sont : SAG1, ROP2, GRA1, GRA2 et GRA4.

2. Cas des ESA

La communication du parasite avec sa cellule-hôte passe par des phénomènes de sécrétion.

Le toxoplasme se caractérise par la présence de trois organites de sécrétion distincts :

- les micronèmes et les rhoptries qui interviennent lors du processus d'invasion de la cellule,
- les granules denses impliqués dans les phénomènes d'installation des toxoplasmes au sein de la vacuole dite "parasitophore"(VP). La VP est une zone d'interface et d'échanges vitaux entre le parasite et la cellule-hôte. La maturation de cette vacuole résulte de la sécrétion du contenu des granules denses du parasite et de la formation d'un réseau de tubules membranaires dans l'espace intravacuolaire.

La sécrétion par *T. gondii* est un événement important surtout en phase aiguë : les ESA sont donc une des premières cibles du système immunitaire. Ils sont protecteurs dans un modèle d'infection aiguë par immunisation directe chez la souris. Le transfert passif d'immunsérums ou de cellules T, prélevés chez des rats Fisher euthymiques vaccinés avec les ESA, à des rats nude se traduit par un allongement de leur durée de vie (Darcy F *et al*-1988 ; Duquesne V *et al*-1990).

3. Cas de SAG1

Parmi différentes approches d'antigènes possibles, pratiquement toutes les équipes ont choisi de se concentrer sur la protéine P30, dénommée SAG1 dans la nouvelle nomenclature.

a. Description de P30

- Elle a été isolée et purifiée pour la première fois en 1983 par Kasper LH *et al* grâce à la technique d'immunoabsorption utilisant un anticorps monoclonal capable de lyser les tachyzoïtes en présence de complément.
- C'est la protéine la plus abondante de la membrane du tachyzoïte (elle constitue 3 à 5 % des protéines totales). Elle est ancrée à la surface du parasite par une copule glycosyl-phosphatidyl-inositol (GPI). Elle rentre également dans la constitution de la vacuole parasitophore.
- Sa masse moléculaire apparente, déterminée par chromatographie d'exclusion sur gel SDS-acrylamide, est d'environ 27-28 kDa en conditions non réductrices et se situe entre 30-35 kDa en conditions réductrices. Cette variation du poids moléculaire serait due à la présence d'au moins un pont disulfure à l'intérieur de la molécule.
- Le gène de P30 a été cloné en 1988 par Burg JL *et al*. La séquence génomique code pour une protéine native de 34.7 kDa possédant des domaines hydrophobes à ses deux extrémités. La portion aminoterminal est une séquence d'une trentaine d'acides aminés appelée séquence signal car elle joue un rôle déterminant pour amorcer le mécanisme d'exportation de la molécule à la surface du parasite. L'extrémité carboxyterminale servirait à l'insertion du glycolipide d'ancrage.

Ce précurseur va ensuite subir des modifications post-traductionnelles : la coupure du peptide signal, le remplacement de la séquence C-terminale par le GIP et une N-glycosylation.

L'électrophorèse bidimensionnelle a mis en évidence plusieurs formes de SAG1, extrêmement proches les unes des autres, qui sont en fait, le reflet des différents degrés de maturation de la protéine.

- Il y a une corrélation positive entre la virulence et l'expression de SAG1 (Kasper LH *et al*-1993). SAG1 est impliquée dans l'attachement du parasite aux cellules hôte. Elle est également impliquée dans le phénomène d'invasion car des anticorps anti-SAG1 prélevés dans les sécrétions intestinales de souris infectées par voie orale inhibent l'infection des cellules hôtes (Mineo JR *et al*-1994).

b. Intérêt P30

- Cette protéine est remarquable en raison de la rapidité et de la constance de la réponse immunitaire au cours de la primo-infection et de l'infection congénitale.

Elle est fortement immunogénique dans la toxoplasmose humaine et expérimentale. Elle induit une forte réponse anticorps polyisotypique et a été proposée comme élément majeur du diagnostic car elle constitue une cible privilégiée des immunoglobulines sériques, dans les phases aiguës (IgM, IgG, IgA) et chronique (IgG) de l'infection. Elle est également reconnue par les IgA intestinales et lactées chez la souris ainsi que par les IgA lactés de femmes en phase aiguë d'infection (Chardes T *et al*-1990).

- Les anticorps monoclonaux et polyclonaux dirigés contre p30 sont parasitocides *in vitro* et leur transfert passif donne un certain degré de protection (Johnson AM *et al*-1983).

- P30 provoque la sécrétion d'IFN- γ par des lymphocytes humains. Chez la souris, P30 est capable d'induire une activité lytique, spécifique de l'antigène, dépendante des cellules T. Cette CTL est médiée par les CD8⁺ (Khan IA *et al* 1988). En 1994, les mêmes chercheurs montrent que le clone C3 anti-SAG1 de phénotype CD8⁺ est capable d'induire 100% de protection contre une infection aiguë après transfert à des animaux normaux.

La protéine P30, très prometteuse en tant que candidat vaccin, a été utilisée dans la plupart des stratégies vaccinales. Ces stratégies feront l'objet de la dernière partie de cette thèse.

T. GONDII

ET

APPROCHES VACCINALES

I. MODELE MURIN

1. Objectifs de la vaccination

Lors des essais vaccinaux, la question fondamentale est de savoir si une protection stérilisante est atteinte et dans le cas contraire, si on peut laisser sans danger s'établir une infection.

D'après les travaux de Yap GS *et al*-1998, une immunisation incomplète résulte en une phase apparente de dormance non rencontrée lorsque l'individu est non immun ou complètement protégé. La réponse immune est importante pour générer une telle forme et pour la garder quiescente car une réversion se produit chez les souris GKO.

Leur protocole utilise une préparation d'antigènes solubles issus de tachyzoïtes (STAg) associée à de l'IL-12. Il protège 70% des souris contre 2×10^3 tachyzoïtes RH administrés par voie sous-cutanée. Les souris ayant résisté au challenge montrent néanmoins des signes morbides 1 à 3 semaines après l'infection : l'aspect terne du pelage et la posture (dos arrondi) sont caractéristiques d'une infection.

Des échantillons de tissu cérébral issu de souris immunisées, injectés dans le péritoine de souris déficientes en IFN- γ , provoquent la mort de toutes les souris 9 jours après l'inoculation. L'examen microscopique des cellules péritonéales a mis en évidence des tachyzoïtes intra et extracellulaires. Les parasites ont le même génotype et conservent la virulence des toxoplasmes utilisés lors du challenge : leur administration chez des souris C57BL/6 se solde donc par la mort de 6 souris sur 7.

Le traitement par PAS (periodic acid-Schiff) puis éosine-hématoxyline des coupes de tissu cérébral chez les survivantes à long terme, a permis de visualiser des kystes qui sont moins colorés que ceux habituellement isolés avec la souche ME49. Cette forme n'est pas transitoire : les expériences d'inoculation 1 an plus tard prouvent que les kystes persistent et sont stables.

Toutes les analyses complémentaires indiquent qu'on a affaire à un stade intermédiaire, distinct des kystes matures mais où la transformation en bradyzoïtes a commencé :

- les kystes sont positifs pour BAG1 et négatifs pour SAG2.
- la paroi kystique est visible en microscopie électronique. Cette paroi est composée d'une membrane unique émettant de nombreuses invaginations à l'intérieur d'une couche sous-jacente. Les zoïtes à l'intérieur des kystes sont hétérogènes du point de vue taille et degré de différenciation : à côté des zoïtes matures, certains sont indifférenciés, dépourvus d'organites apicaux et de granules de polysaccharides, d'autres montrent des changements dégénératifs. Les zoïtes matures contiennent un noyau localisé postérieurement, des micronèmes et plusieurs granules de glycogène. Tous ces caractères sont typiques du stade bradyzoïte. Cependant, la majorité des rhoptries sont caractéristiques des tachyzoïtes : allongées avec une texture en « nid d'abeilles » (les rhoptries des bradyzoïtes sont bulbeuses et d'aspect uniforme). Elles sont métaboliquement actives comme le prouve les nombreuses vésicules autour du golgi, jamais rencontrées dans la forme bradyzoïte.
- alors que les bradyzoïtes normaux sont capables de résister à l'action protéolytique provoquée par le traitement pepsine-HCL, ici, les kystes sont sensibles à la digestion.

Cette expérience permet d'éliminer la possibilité d'une immunisation partielle.

L'objectif poursuivi est donc d'obtenir une immunité complètement stérilisante, évitant toute infection. Cet objectif, jamais atteint dans une autre vaccination, est probablement utopique.

2. Vaccins vivants atténués

La mise au point d'une souche vivante de virulence atténuée a représenté une étape marquante dans la mise en place de stratégies d'immunisation.

Pfefferkorn et Pfefferkorn ont isolé la souche ts-4 en 1976. Elle est dérivée de la souche RH par une mutagenèse chimique utilisant la N-méthyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. Ce mutant est thermosensible : sa croissance, déjà légèrement plus faible que la souche parent à 37°, diminue à partir de 38° puis se ralentit de plus en plus au fur et à mesure de l'élévation de température. Les tachyzoïtes sont incapables de se développer *in vitro* à une température supérieure à 40°.

a. Intérêts de la souche ts-4 (McLeod R *et al*-1988 ; Waldeland H *et al*-1983)

- elle est avirulente chez les souris immunocompétentes : l'inoculation de doses supérieures à 10^5 tachyzoïtes n'entraîne aucun signe de maladie,
- elle ne forme pas de kyste,
- elle ne persiste pas dans l'organisme : le parasite est indétectable 2 mois après l'injection,
- les souris BALB/c vaccinées par voie sous-cutanée ou orale avec le mutant ts-4 développent une résistance complète lors d'un challenge oral ou parentéral avec la souche hautement virulente RH.

Toutes ces observations expliquent que le modèle a été très étudié ; il a permis d'élucider les bases immunologiques de l'immunité acquise avec des souches normales de *T. gondii*.

b. Résistance des souris immunocompétentes

Les mécanismes qui sous-tendent la résistance des souris vaccinées avec le mutant ts-4 ont été étudiés en détail par Gazzinelli RT *et al*-1991.

→ Ils sont sous la dépendance de l'IFN- γ puisqu'un anticorps anti-IFN- γ abroge totalement l'immunité induite par la vaccination ts-4.

→ Ils font appel à l'action synergique des CD4+ et des CD8+.

- Les travaux concernant les lymphocytes T ont été menés au moment de l'infection test, c'est-à-dire durant la phase aiguë. La neutralisation des cellules CD4+ et CD8+ a été faite par l'administration d'anticorps monoclonaux. La déplétion conjointe des CD4+ et des CD8+ a plus de répercussion qu'une déplétion en CD8+. Ces résultats sont en accord avec ceux de Suzuki et Remington-1988 : ils ont montré que le transfert de CD4+ et CD8+ offre un meilleur modèle de protection que le transfert d'une seule des deux populations cellulaires.

- Lorsqu'ils sont stimulés par des extraits parasitaires, les lymphocytes CD4+ sont responsables de la synthèse des cytokines de types 1 : IL-2 et IFN- γ . Aucune trace de cytokines de type 2, IL-4 et IL-5, n'est retrouvée dans le milieu. Les CD4+ sont les seules cellules à produire de l'IL-2 car un anticorps anti-CD4+ abolit complètement la production de cette cytokine.

- Les CD4+ jouent un rôle non négligeable mais mineur : en l'absence de CD8+, la synthèse d'IFN- γ n'est pas suffisante pour prévenir le décès des souris infectées par la souche RH.

- Les CD8+ sont les principaux effecteurs : le traitement des souris, au moment du challenge, par des anticorps anti-CD8+ abroge complètement la résistance. Il n'en va pas de même pour les anticorps anti-CD4+ qui n'ont aucune répercussion.

- De manière surprenante, les cellules spléniques CD8+ des souris vaccinées, prélevées au moment du challenge, incubées en présence de CON A et d'antigènes de *T. gondii*, produisent moins d'IFN- γ que les CD4+. Néanmoins, de grosses quantités d'IFN- γ sont détectées lorsque les CD8+ sont exposées à de l'IL-2 exogène. Toutes ces données ont permis de conclure que les cellules CD4+, via leur synthèse d'IL-2, augmentent la production d'IFN- γ par les cellules CD8+.

c. Chez l'hôte immunodéprimé

Paradoxalement, jusqu'en 1996 et les travaux de Sayles PC et Johnson LL, la virulence de la souche ts-4 chez des hôtes immunodéprimés n'était pas encore connue. La seule certitude était qu'une infection létale se produit chez la souris déficiente en cellules T.

Trois mécanismes avaient été avancés pour expliquer la résistance à l'infection chez les souris immunocompétentes :

- l'infection est auto-limitée *in vivo*,
- l'infection, en augmentant la température, limite la croissance du parasite,
- l'infection est contrôlée par les défenses immunitaires.

Les 2 premières hypothèses ont été réfutées par cette étude.

In vivo, la souche ts-4 est capable de persister longtemps chez des souris dont l'immunité est atteinte de façon moyenne : des souris $A\beta^{0/0}$ déficientes en CMH II, n'ayant plus de cellules CD4⁺ fonctionnelles, peuvent survivre 86 jours après l'injection intra-péritonéale de tachyzoïtes. Des résultats identiques ont été obtenus avec des souris déficientes en CD8⁺. La mortalité est cependant de 100 % : l'infection n'est donc en aucun cas auto-régulée.

Ce mutant n'induit pas d'élévation de température qui pourrait lui être fatale :

- la fièvre est peu sévère : rares sont les souris dont la température s'élève en dessus de 38°, que ce soit chez les souris résistantes B6 ou chez les souris sensibles C57BL/6 SCID/SCID ;
- lorsque les souris B6 déclarent la maladie, leur température rectale est plus basse que le groupe témoin non infecté ;
- le pic de température des souris SCID n'empêche pas qu'elles succombent à l'infection.

Le rôle essentiel des CD4⁺ et CD8⁺ dans la survie à long terme des souris a été largement démontré par Gazzinelli *et al.* Des données complémentaires sont toutefois apportées ici :

- un système immunitaire intact et mature est nécessaire pour survivre à l'infection ts-4 car l'inoculation de la souche chez des souris SCID, néonatales ou irradiées, se solde par la mort de l'hôte ; les souris SCID ne résistent à l'infection que si elles reçoivent des splénocytes le jour de l'inoculation.

- une augmentation de l'IFN- γ et de l'activité NK a lieu dans la cavité péritonéale de J4 à J11 avec un pic à J7. Le rôle central de l'IFN- γ est confirmé dans une expérience où les souris SCID traitées avec un anticorps anti-IFN- γ meurent nettement plus vite. Dans ce cas, l'IFN- γ est produit par des cellules autres que CD4⁺.

- la résistance précoce à l'infection est dépendante de l'IFN- γ et des Thy⁺CD4⁻CD8⁻. Les cellules CD4⁺ et CD8⁺ interviennent un peu plus tard dans l'infection.

d. Toxoplasmose congénitale

Des souris gestantes immunisées avec cette souche par voie sous-cutanée puis soumises à une épreuve par voie orale donnent cependant naissance à des souriceaux infectés. Une protection partielle des souriceaux est observée lorsque l'immunisation est réalisée par voie orale (McLeod R *et al*-1988). La protection n'est donc pas totale puisque la transmission du parasite est toujours possible.

3. Vaccins à base de protéines

a. Utilisation de SAG1

Après les parasites entiers atténués, l'expérimentation d'antigènes parasitaires purifiés comme vaccins potentiels a été entreprise. La récolte d'antigènes s'est faite à partir d'extraits détergés de tachyzoïtes de la souche RH.

❖ SAG1 + liposome

Les liposomes sont des vésicules sphériques dont le centre est occupé par une cavité aqueuse, et dont l'enveloppe est constituée par un nombre variable de feuilletts bimoléculaires à base de phospholipides. La similitude de constitution entre une telle bicouche lipidique et une membrane cellulaire fut rapidement utilisée en immunologie comme système de transport d'antigènes. Cet adjuvant est idéal pour les antigènes membranaires qui possèdent une ancre hydrophobe (cas de P30).

D'une façon générale, l'encapsulation, quelle que soit la voie d'administration, favorise la production d'IFN- γ .

Bulow R et Boothroyd JC-1991 ont choisi la voie intrapéritonéale pour administrer les liposomes de P30 à des souris Swiss-Webster. Deux immunisations à deux semaines d'intervalle sont nécessaires pour protéger les animaux contre un challenge de 10^5 tachyzoïtes de la souche C et la protection est dose-dépendante.

Une réponse IgG anti-SAG1 est observable dans les 2 groupes expérimentaux ayant reçu la protéine SAG1, seule ou en association avec les liposomes. L'encapsulation n'a pas amplifié la réponse humorale.

Seules les souris immunisées par les liposomes développent une réponse protectrice contre un challenge létal, comme en témoignent les taux de mortalité. Il est regrettable que les chercheurs n'aient pas examiné le cerveau des souris pour estimer le nombre de kystes ; ils ne peuvent pas savoir s'ils sont arrivés à une immunité stérilisante ou une simple protection.

❖ SAG1 + adjuvant de Freund (Kasper LH *et al*-1985)

L'adjuvant incomplet de Freund (AIF) est une émulsion simple d'eau contenant l'antigène dans l'huile minérale. Cet adjuvant retarde la destruction de l'antigène et augmente sa dispersion, ce qui assure la libération progressive et espacée de l'antigène dans les lymphatiques et les ganglions à partir de multiples microfoyers formés par les gouttes de l'émulsion.

En 1945, Freund incorpora le détergent Arlacel A (monooléate de mannitol) dans son AIF pour faciliter l'émulsion. Des mycobactéries furent ajoutées, ce qui donne l'adjuvant complet de Freund (ACF). L'ACF a été l'adjuvant le plus utilisé sur les animaux de laboratoire au cours des 40 années passées. Cet adjuvant entraîne une prolifération et une activation des lymphocytes, notamment des cellules T. Toutefois, il donne des réactions granulomateuses au site d'injection, ce qui interdit son emploi dans les vaccins humains ou vétérinaires. Il a cependant été testé chez les souris, en association avec P30 : la protéine seule a un effet protecteur et cet effet est aboli par l'emploi d'ACF.

❖ SAG1r

Dans le cadre de la plupart des maladies parasitaires, l'immunité est corrélée avec la réponse dirigée contre un faible nombre de protéines, présentes essentiellement à la surface de l'agent pathogène. Par conséquent, on a espéré que la production en grande quantité de ces protéines immunogènes pourrait permettre le développement rapide de nouveaux vaccins.

Avec la survenue du clonage génétique et des techniques d'expression, une telle approche s'est révélée réalisable. La protéine SAG1 a été la première à être obtenue par manipulation génétique.

Les travaux visant à immuniser les souris en utilisant la protéine recombinante SAG1r seule ont donné les mêmes résultats que ceux effectués avec la protéine naturelle purifiée. La présence d'IgG1 anti-SAG1r et l'absence d'IgG2a a démontré que cet antigène induisait une réponse humorale de type 2. La détection des cytokines, produites par les splénocytes stimulés *ex vivo* par du TLA, a mis en évidence une diminution de la réponse de type 1 : la production d'IL-2 et d'IFN- γ est nettement plus faible que dans le groupe témoin traité par de l'eau stérile. Ces résultats sont en accord avec ceux publiés en 1994 par Godard I *et al.* Ces chercheurs se sont aperçus qu'en fragmentant la protéine SAG1 en cinq peptides, quatre peptides orientaient vers une réponse humorale de type 2 lorsqu'ils étaient administrés par voie sous-cutanée ou intraveineuse chez la souris.

❖ SAG1r + IL-12 (Letscher-Bru V *et al.*-1998)

L'IL-12 utilisée *in vivo* en association avec la protéine SAG1r a entraîné :

- une augmentation de la synthèse de cytokines de type 1 (IFN- γ et IL-12) par les splénocytes restimulés *in vitro* avec du TLA.
- la suppression de la synthèse d'IL-4, spécifique de la sous-population Th2.

Nous avons vu que l'IL-12 agit très tôt sur les NK et les cellules T indifférenciées, les orientant vers la production d'IFN- γ et un modèle Th1. L'IL-12, elle même, puis l'IFN- γ ont un effet inhibiteur sur la production d'IL-4.

La production d'IgG1 est diminuée de moitié dans le groupe traité par SAG1r-IL-12 par rapport à celui où SAG1 a été utilisée seule, mais la différence n'est pas significative. La persistance des IgG1, malgré l'absence d'IL-4 et la présence d'IFN- γ , peut s'expliquer de plusieurs façons : la concentration en IL-4 est inférieure au seuil de détection mais est suffisante pour provoquer la synthèse d'IgG1 ; la production d'IgG1 est en grande partie indépendante de la production d'IL-4.

Une chose tout à fait surprenante est l'absence des IgG2a. La charge cérébrale des souris vaccinées est néanmoins diminuée de 40%.

❖ SAG1r + Quil A (Khan IA *et al*-1991)

▪ Choix de l'adjuvant

Beaucoup d'agents tensioactifs cationiques ou non ioniques ont montré des propriétés adjuvantes. Les plus largement utilisés ont été les saponines de plantes, des glycosides de triterpènes et de stérols fixant le cholestérol. Ils ont été appliqués avec succès chez les animaux. Leur rapport avantages/effets indésirables a été amélioré par la purification des saponines et la détermination de celles ayant l'activité adjuvante la plus efficiente. La saponine Quil A obtenue sur *Quillaria saponaria* est la plus utilisée.

▪ Résultats expérimentaux

L'immunisation de différentes espèces de souris avec la protéine P30 associée à Quil A les protège contre un challenge léthal oral de 50 kystes de la souche ME49 :

- 90% des souris CD1 ont survécu à l'infection aiguë alors que la mortalité atteint 95% dans le groupe immunisé par P30 utilisée seule. Aucun kyste cérébral n'est visible chez ces souris.
- les souris C57BL/6 et A/J ne sont pas totalement protégées contre la formation de kystes mais leur charge parasitaire cérébrale est nettement diminuée par rapport au groupe contrôle.

▪ Rôle des CD8+ et des CD4+

Les cellules T sont impliquées dans le contrôle de la formation de kystes cérébraux chez les souris immunisées et le rôle majeur dans l'immunité protectrice est attribué aux CD8+.

Les études de transfert de cellules spléniques, issues de souris immunes, démontrent que les lymphocytes T protègent les souris receveuses contre une infection aiguë. Le traitement des souris receveuses avec un anticorps anti-CD8+ entraîne une abolition complète de la protection ; un anticorps anti-CD4+ ne provoque aucun changement.

Une population splénocytaire enrichie en CD8+ s'est révélée directement cytotoxique vis-à-vis de parasites extracellulaires marqués par un radio-isotope. La fraction CD4+ ne semble pas intervenir dans ce processus.

▪ Conclusion

Ce travail a mis en évidence le rôle primordial de l'immunité à médiation cellulaire dans la résistance à *T. gondii* en phase aiguë et chronique.

Cependant, les saponines provoquent une rupture membranaire et sont cytolytiques : il est donc souhaitable d'atteindre l'effet adjuvant sans laisser trop de saponines libres. Ceci a été obtenu par des préparations où des protéines ont été assemblées avec des lipides membranaires et de la Quil A pour produire des complexes stimulateurs de l'immunité appelés ISCOMs.

❖ **SAG1r + alun** (Petersen E *et al*-1996)

En matière de vaccination, le deuxième adjuvant le plus utilisé est l'alun (hydroxyde ou phosphate d'alumine) ; il est le seul accepté partout par les autorités de contrôle pour les vaccinations humaines et vétérinaires.

▪ Résultats expérimentaux

Les solutions d'antigènes précipités par l'alun provoquent le développement d'un granulome local au site d'injection et sont très efficaces pour susciter la formation d'anticorps. Quatre doses intra-musculaires de 20 µg de SAG1 adsorbée sur 0.5 mg d'Al(OH)₃, administrées toutes les deux semaines, sont nécessaires pour induire la formation maximale d'anticorps. L'alun suscite surtout des anticorps de classe IgG1 chez la souris alors que les challenges par des tachyzoïtes RH ou des kystes de la souche SSI119 accroissent la production d'IgG2a. Cela prouve que la réponse avec l'alun est conduite selon un modèle de type 2 alors que la réponse à l'infection avec des tachyzoïtes vivants est de type 1.

Il a été dit que l'alun possède une activité limitée lorsqu'il est utilisé dans les vaccins recombinants ou synthétiques et qu'il ne stimule pas les cellules CTL. Le modèle installé laissait présager une vaccination inefficace. Contre toute attente, l'immunisation a donné, en terme de mortalité, un degré significatif de protection contre un challenge intrapéritonéal par la souche RH et contre une infection sous-cutanée avec SSI119.

Deux hypothèses sont évoquées pour expliquer la résistance acquise :

- la réponse Th2 engendrée par l'immunisation servirait de régulateur négatif pour la réponse Th1 induite par le challenge : elle préviendrait les lésions inflammatoires et toute autre pathologie liée à une réponse Th1 excessive.

- les chercheurs ont également mis à l'honneur le rôle de la réponse humorale : des tachyzoïtes incubés en présence d'anticorps issus de souris immunisées ont été testés *in vitro* pour leur capacité à infecter des cellules Vero. Le nombre de cellules infectées, visualisé après fixation par du méthanol et coloration par du giemsa, est nettement diminué : l'inhibition de l'invasion cellulaire est donc prouvée mais n'est que partielle.

▪ Conclusion

Même si l'adjuvant choisi n'était pas, à priori, adapté pour la vaccination anti-toxoplasmose, ce choix a été très utile car il a permis d'apprécier le rôle de la réponse humorale et de nuancer le rôle Th1.

Cependant, le nombre de kystes utilisé dans l'expérience est bas et ne permet pas de faire une comparaison de charge cérébrale ; la moyenne des kystes chez les souris immunisées est quand même un peu plus haute que celle du groupe témoin : ce résultat aurait du être approfondi.

b. Utilisation de SAG2

Outre la faiblesse de leur pouvoir immunogène, il y a un autre problème associé aux vaccins protéiques : c'est leur incapacité à pénétrer dans certains compartiments cellulaires. En particulier, il est difficile d'obtenir des réponses cytotoxiques spécifiques du CMH de classe I par une immunisation *in vivo* avec la protéine utilisée seule. Une méthode possible pour trouver une solution à ces difficultés est d'utiliser des ISCOMs.

❖ Les ISCOMs

Ces micelles lipidiques peuvent fusionner avec les membranes cellulaires :

- les protéines, enfermées dans les ISCOMs, peuvent être transférées dans le cytoplasme d'une CPA, leur permettant d'être transportées dans le réticulum endoplasmique où elles se lient aux molécules du CMH I et sont ainsi véhiculées jusqu'à la surface de la cellule sous la forme d'un complexe peptide-CMH.
- les protéines peuvent être délivrées dans le cytosol d'autres types cellulaires où elles sont apprêtées et présentées comme des protéines endogènes.

Ce vecteur est donc excellent pour stimuler les CD8⁺ cytotoxiques.

Au départ, la méthode a été expérimentée pour les protéines virales mais par la suite de nombreux procédés ont été décrits pour préparer des ISCOMs contenant des protéines hydrophobes, des protéines recombinantes et des peptides.

❖ Expérience antérieure

Une expérience tout à fait prometteuse a été conduite en 1993 par l'équipe de Lunden A. Un vaccin préparé à partir d'extraits de tachyzoïtes incorporés dans des ISCOMs a protégé des souris contre des tachyzoïtes injectés dans la cavité péritonéale ou des oocystes par voie orale. De hauts titres en anticorps et une réaction d'hypersensibilité retardée ont été notés chez les souris immunisées.

Malgré l'absence de protection lors d'un challenge par kystes tissulaires, les résultats obtenus ont encouragé les chercheurs à persister dans cette voie.

Les antigènes incorporés dans le complexe ont été définis : les principales protéines du complexe étaient P30 et P22 et un antigène d'un PM voisin de 6,000. D'autres antigènes de masse moléculaire supérieure à 30,000 étaient également présents mais en quantité moindre.

❖ P22 et ISCOM (Lunden A *et al*-1997)

La protéine P30 faisant l'objet d'un grand nombre de publications, les chercheurs ont choisi la protéine P22. Le gène codant SAG2 a été cloné et séquencé par Parmley SF *et al* en 1992. Il a été produit par PCR, introduit dans le vecteur pGEX-2T et exprimé chez *E. coli* en tant que protéine fusionnée avec la glutathion S-transférase (GST). Les ISCOMs ont été préparés en s'inspirant de la méthode de Morein *et al*-1990 : les protéines ont été incorporées en abaissant le pH afin d'exposer les régions hydrophobes. Après réduction du pH à 2.5, le mélange protéines-cholestérol-phosphatidylcholine-Quil A est dialysé et les ISCOMs sont isolés par centrifugation.

Cinq immunisations par voie sous-cutanée ont été effectuées. Aucune protection n'est observée après un challenge de 3,000 oocystes sporulés de la souche ME49 ou 10 kystes tissulaires de la souche C56. Les souris immunisées meurent plus vite que les souris non vaccinées.

L'augmentation de la susceptibilité peut s'expliquer de deux manières :

- l'emploi d'ISCOMs
- la présence de la protéine GST : Un ISCOM contenant uniquement la GST donne les mêmes résultats. Il est fort probable que l'effet négatif soit dû à un phénomène d'interférences immunes. Bien qu'aucune réaction croisée entre les antigènes de toxoplasmes et cette protéine n'est été mise en évidence, la GST interagit de manière spécifique soit avec *T. gondii* soit avec les mécanismes impliqués dans la résistance contre ce parasite. Il est d'un grand intérêt d'étudier plus en détail les mécanismes de cette interaction car le système d'expression GST est largement utilisé car très pratique.

c. Utilisation des granules denses (Mevelec MN *et al*-1998)

❖ GRA2 et GRA5

La participation des granules denses dans l'immunité protectrice contre *T. gondii* a été relatée par plusieurs auteurs : Sharma SD *et al*-1984 et Cesbron-Delauw MF-1994 sont arrivés à des niveaux significatifs de protection en utilisant les granules GRA2 ou GRA5.

❖ GRA4

La séquence complète de GRA4 a été déterminée par Mévélec MN *et al* en 1992. La molécule est constituée d'une séquence signal N-terminale et de deux grands domaines structuraux, séparés par une région hydrophobe de 19 acides aminés.

▪ Préparation des protéines recombinantes

Les protéines recombinantes n'ont été obtenues qu'au prix de multiples difficultés :

- la protéine recombinante correspondant à la séquence 25-345 est insoluble (on impute ce caractère à la région hydrophobe).

- la présence d'une séquence PEST (241-265) rapidement dégradée et d'une séquence riche en lysine (265-274) sensible au clivage protéolytique contraint les chercheurs à utiliser une souche d'*E. coli* avec une activité protéolytique réduite.

Finalement, la protéine C (aa 297-345) et la protéine N (aa 25-276), toutes deux solubles, ont été produites en quantité importante grâce à l'emploi du plasmide pGEX. Les formes solubles de GRA4 ont donc été exprimées dans *E. coli* sous forme de protéines de fusion avec la glutathion S-transférase.

▪ Propriétés antigéniques

L'antigénicité des protéines recombinantes a été analysée en utilisant un panel d'anticorps.

→ Le domaine C de GRA4 est particulièrement bien reconnu par les IgG sériques d'hommes et de moutons infectés. Ceci est en accord avec les travaux publiés par Johnson et Illana-1991, proposant la protéine recombinante 293-345 comme test diagnostique d'une toxoplasmose aiguë.

La localisation des sites antigéniques importants a été établie en créant toute une série de délétions au niveau de la séquence C. Les différentes protéines ont été testées pour leur réactivité en ELISA avec des sérums contenant des IgG anti-GRA4.

Cette méthodologie a mis en évidence 2 épitopes :

- l'épitope majeur B est localisé à l'intérieur des 11 résidus C terminaux,
- un second épitope, reconnu avec une fréquence inférieure, se situe dans la région 318-334.

Là encore, il existe des variations liées à l'origine des sérums : le sérum des souris C57BL/6 (H-2b) infectées par la souche 76K ne réagit qu'avec l'extrémité terminale de GRA4 alors que celui des CBA/J (H-2k) reconnaît 2 épitopes (le premier épitope 334-345 et un second 334-326).

La spécificité dépend également du type de parasite : les résultats obtenus avec les souches C, PON, RUB, Castels diffèrent de ceux utilisant la souche 76K ou Prugniaud.

→ En contraste, le domaine N n'est que faiblement reconnu, que ce soit par les anticorps de souris infectées (IgG sériques, IgA du lait et des sécrétions intestinales) ou par les IgG d'hommes ou de moutons. Cependant, il existe bien des épitopes B car des souris immunisées oralement avec la protéine recombinante produisent des anticorps réagissant avec les tachyzoïtes lors des essais d'immunofluorescence. Des programmes informatiques perfectionnés ont permis de localiser un épitope B dans le résidu 229-249 du domaine N.

Le domaine N contient, par contre, un épitope T majeur. Le peptide 229-242 induit une prolifération des lymphocytes T spléniques chez les souris infectées CBA/J.

▪ Protection

Le point important qui ressort des publications de Mevelec MN *et al*-1992 est que la molécule GRA4 est un antigène cible des réponses muqueuses et systémiques. La piste des vaccins administrés par voie orale a donc été poursuivie en utilisant les protéines N et C. La protéine NC (acides aminés 25-276 fusionnés avec 297-345), qui combine l'épitope B du domaine C et l'épitope T du domaine N est un candidat tout trouvé.

L'immunisation orale avec N, C, NC en association avec la toxine cholérique induit une production significative d'IgG sériques anti-GRA4 mais une réponse IgA intestinale faible *et aléatoire*. L'administration de plus grandes quantités d'antigènes résout partiellement ce problème. La susceptibilité des molécules à la dégradation protéolytique intestinale influence directement la réponse immune et peut expliquer l'hétérogénéité des réponses protectrices : en

effet, la protection, évaluée en terme de mortalité lorsque des doses létales sont utilisées, n'est pas reproductible d'une expérience à l'autre.

Ce type de vaccin présente un autre inconvénient majeur : les souris développent des niveaux significatifs d'IgG1 et d'IgG2b mais pratiquement pas d'IgG2a. L'activation du modèle Th2 peut être attribuée à l'emploi de la GST ou de la toxine cholérique. Aucun élément ne permet de trancher entre ces deux hypothèses.

Cette étude met cependant en valeur l'effet protecteur de la protéine NC lorsque des doses sublétales sont employées. Les taux de protection, en terme de réduction du nombre de kystes au niveau cérébral, sont similaires à ceux obtenus avec les extraits de *T. gondii* (Tso) associés à la toxine cholérique.

4. Vaccins à base de peptides

De petites séquences peptidiques qui correspondent à certains épitopes importants d'antigènes parasitaires, peuvent être synthétisées facilement et à bon marché. Les peptides présentent d'autres avantages : ils sont clairement définis, homogènes, sûrs et faciles à manipuler.

a. Peptides de SAG1 (Velge-Roussel F *et al*-1997)

Le travail sur les peptides a débuté en prenant comme modèle la principale protéine du tachyzoïte. La carte des épitopes de SAG1, établie par Guillet JG *et al* en 1991, a permis de sélectionner une région située dans la partie NH2 terminale de la protéine. D'après les conclusions de Velge-Roussel F *et al*-1994, cette séquence (125-165) renferme au moins trois épitopes T et semble indispensable à l'activation des cellules B. La même équipe a donc décidé de synthétiser, en 1997, le peptide correspondant appelé V41T ainsi que 3 autres fragments se chevauchant : V16V, N17V, G16V.

❖ Etudes préliminaires

- Des recherches dans des banques de données ont révélé le caractère unique du peptide V41T.

- Ce peptide synthétique est reconnu par le sérum de souris infectées mais la réponse anti-V41T est basse, évaluée par la méthode ELISA à 20-25% de la réponse totale anti-protéine. En utilisant la technique d'immunotransfert, l'incapacité du sérum des souris infectées à reconnaître V41T suggère que le peptide adopte une structure tridimensionnelle en solution, qu'il perd lorsqu'il est transféré sur nitrocellulose.

- V41T est capable de restimuler les cellules T de souris infectées. Le peptide est reconnu de la même manière que la protéine SAG1. Le fait que V16V et G16V donnent des réponses aussi élevées que V41T prouve que plusieurs épitopes T sont présents.

Un épitope immuno-dominant est inclus dans le fragment N17V car la réponse proliférative contre ce peptide est plus de 3 fois supérieure à celle ayant lieu avec la protéine entière.

N17V porte d'ailleurs l'enchaînement ADSLTGPV avec deux résidus D et V séparés par 5 acides aminés. D'après Rammensee *et al*-1995, ce modèle est spécifique de l'haplotype H-2^k ; le complexe CMH I-peptide serait la cible principale des CTL.

❖ Expériences et résultats

La réponse immunitaire induite après immunisation par voie sous-cutanée a été évaluée chez deux variétés différentes de souris. V41T a été administré avec l'adjuvant ACF lors de la première injection et avec l'AIF lors du rappel.

▪ Chez les souris CBA/J

Le peptide est capable de fournir une protection partielle contre un challenge oral par des kystes de la souche 76K. La charge cérébrale est diminuée de 35% et le taux de survie des souris est accru.

Les propriétés immunologiques du peptide sont confirmées par la production d'une réponse humorale spécifique IgG anti-V41T. Cependant, là encore, les anticorps ne réagissent pas avec la protéine native : les épitopes B de SAG1 ne sont accessibles que lorsque la protéine est dépliée. Deux prolines dans la séquence pourraient expliquer la différence de conformation du peptide par rapport à P30.

La prolifération spécifique des cellules T issues de ganglions lymphatiques de souris immunisées, a été déclenchée *in vitro* par le peptide et par la protéine entière. Le « traitement » naturel de SAG1 conduit à la production du peptide V41T qui est présenté aux récepteurs de cellules T sous la forme d'un complexe avec le CMH.

▪ Chez les souris C57BL/6

L'immunisation n'a apporté aucune protection. Ce résultat était en partie prévisible car :

- cette espèce est connue pour sa forte susceptibilité à l'infection ;
- aucune séquence peptidique correspondant au modèle d'haplotype H-2^b n'a été trouvée ;
- un profil Th2 a été déclenché (les IgG1 et IgG3 anti-V41T sont 10 fois plus élevés chez les C57BL/6 que chez les CBA/J).

▪ Conclusion

On pouvait penser que, malgré une séquence linéaire d'acides aminés correcte, la structure tridimensionnelle aléatoire du peptide synthétique ne donnerait qu'une piètre représentation de la conformation de l'antigène d'origine. Curieusement, d'après cette étude, il ne semble pas que ce soit un inconvénient majeur.

b. MAP (Darcy F *et al*-1992)

Un problème demeure : les antigènes peptidiques, lorsqu'ils sont utilisés sans couplage à une protéine porteuse ou à un vecteur, sont faiblement immunogènes. Afin de contourner la nécessité de vecteurs, une alternative a été proposée : selon le concept décrit par Tam JP-1988 et en prenant exemple sur les résultats obtenus avec le parasite *Schistosoma mansoni*, les chercheurs ont construit un MAP (Peptide Antigène Multiple).

▪ Protocole expérimental

La construction du MAP passe par différentes étapes : purification par HPLC de SAG1 obtenue à partir de tachyzoïtes, détermination de la séquence NH2 terminale de la protéine et élaboration du peptide correspondant.

On a découvert par la suite que cette séquence était identique aux résidus 48-67 de la séquence d'acides aminés déduite à partir d'un clone d'ADNc isolé et séquencé par Burg JL *et al*-1988.

Un MAP est constitué d'une partie centrale de résidus de lysine ramifiés sur laquelle sont branchées 2*n copies d'un peptide. Dans cette expérience, 8 peptides sont liés par leur groupe COOH terminal aux groupe amino de la matrice. Le protocole a consisté en 4 immunisations de souris OF1 et d'un challenge oral par 1200 kystes de la souche 76K.

▪ Résultats

Les anticorps induits par le MAP sont dirigés contre des épitopes linéaires présents dans le peptide ou dans la protéine P30 après dénaturation. En immunofluorescence, ils sont donc incapables de reconnaître la protéine native présente sur les tachyzoïtes.

Malgré ces premiers résultats décevants, les chercheurs ont pu mettre en évidence un effet protecteur et ceci dans deux modèles expérimentaux :

1/ Alors que le peptide sous sa forme monomérique n'induit aucune protection, 45% des souris immunisées par le MAP étaient encore vivantes 75 jours après l'infection test. L'immunisation avec le MAP confère le même degré de protection que les ESA.

2/ Le transfert passif de lymphocytes T issus de rats Fisher immunisés avec le MAP à des rats nude 1 jour avant leur infection par $5 \cdot 10^4$ tachyzoïtes de la souche RH permet de doubler leur durée de vie.

Les cellules T sensibilisées sont impliquées dans des phénomènes coopératifs. En effet, le transfert s'accompagne d'une augmentation progressive des titres en IgG anti-P30 chez 2/3 des rats.

La constatation qu'un rat sur trois ne produit pas d'IgG laisse penser que la réponse anticorps n'intervient pas dans la protection.

5. Immunisation par voie muqueuse

Les efforts se sont portés depuis une dizaine d'années sur le développement d'un type particulier de vaccins : ces vaccins répondent à la possibilité d'accéder aux muqueuses.

Les deux raisons majeures de ce choix résultent :

- de l'observation de l'implication des anticorps IgA, isotype majeur au niveau de toute muqueuse,
- de la facilité d'utilisation que pourrait constituer des vaccins administrables par voie orale ou nasale.

a. Voie orale

❖ Approche vaccinale de première génération

L'administration d'antigènes par voie orale est peu efficace du fait de la digestion des protéines par les sucs digestifs et du besoin d'adjuvants puissants. L'adjuvant le plus utilisé à ce jour est une toxine, la toxine cholérique (TC), soit sous sa forme native toxique, soit sous sa forme génétiquement modifiée, gardant son pouvoir adjuvant mais dénuée d'effet toxique.

▪ Adjuvant

Le choix de Bourguin *I et al*-1991-1993 s'est porté sur l'utilisation d'une dose infratoxique de toxine cholérique en association avec un extrait parasitaire de toxoplasme.

La toxine cholérique est une protéine composée de deux sous-unités :

- une sous-unité dite lourde : la sous-unité A, composée de deux fragments A1 et A2 reliés par un pont disulfure. C'est la SUA1 qui est responsable de l'effet toxique de la molécule.
- 5 sous-unités dites légères : les sous-unités B, responsables de la fixation cellulaire.

Le récepteur de la TC est le ganglioside GM_1 , présent en quantité importante au niveau des cellules épithéliales intestinales.

Après la fixation ganglioside-TC, le fragment A1 déclenche son activité ADP-ribosyltransférase. Le transfert d'une unité ADP-ribose de NAD⁺ sur un site arginine spécifique de la chaîne α d'une protéine Gs bloque cette protéine dans sa forme active. Il en résulte une activation persistante de l'adénylate cyclase. Le taux d'AMPc anormalement élevé conduit à un flux de Na⁺, Cl⁻ et d'eau dans l'intestin : c'est la diarrhée cholérique.

▪ Résultats

Le but recherché, augmenter les réponses muqueuses et stimuler l'immunité cellulaire, a été pleinement atteint :

- l'effet adjuvant de la TC sur les réponses muqueuses et particulièrement sur la production d'IgA par la muqueuse intestinale est bien démontré. Une augmentation significative du taux IgAs est observée chez les souris immunisées avec 10 μ g de TC associée à 5 mg d'extrait antigénique de toxoplasme (AgT) par rapport à celui observé chez les souris immunisées avec 10 mg d'AgT seul.

- l'augmentation des IgA anti-*T. gondii* intestinales est non seulement due à la réponse IgAs mais aussi à une augmentation de la réponse IgA sérique. La reconnaissance protéique par les IgA sériques, après électrophorèse d'AgT présente le même profil que celle obtenue après électrophorèse des tachyzoïtes solubilisés (Chardes T *et al*-1990). Les protéines caractérisées par les anticorps monoclonaux correspondent à la fois à des protéines cytosoliques (GRA2, ROP) et à la fois à des protéines de surface.

Si l'effet adjuvant de la TC sur la réponse locale est bien connu, il n'en va pas de même pour sa capacité à stimuler les réponses cellulaires. Cette étude fait office de référence : la TC s'est montrée capable d'amplifier la réponse cellulaire systémique de type prolifératif avec stimulation préférentielle de la sous-population lymphocytaire Th1, associée à une sécrétion accrue en IL-2 et IFN- γ .

La SUB, elle, n'a pas entraîné d'augmentation de la blastogénèse. Cette sous-unité, n'ayant pas la propriété d'activer l'adénylate cyclase, n'augmente pas la perméabilité intestinale et n'est qu'un piètre adjuvant.

Les divers mécanismes immunitaires ont conduit à une protection significative des souris C57BL/6 contre une infection orale avec 90 kystes de la souche 76K. Cette protection est corrélée à une baisse de la charge parasitaire.

▪ Conclusion

La TC est un excellent adjuvant chez cette espèce de souris. Le choix des souris C57BL/6 est pertinent : il est admis que l'effet adjuvant de la TC est contrôlé par les gènes de la sous-région I-A du complexe H-2 du CMH. Les souris C57BL/6 d'haplotype H-2^b sont les plus sensibles à l'action adjuvante de la TC.

❖ **Approche vaccinale de seconde génération, utilisation de vecteurs**

Pour être efficace, la vaccination par voie orale doit répondre à deux critères majeurs :

- l'absence de dégradation des antigènes cibles au cours de leur passage dans le tractus gastrointestinal,
- le ciblage des antigènes aux structures lymphoïdes associées aux muqueuses.

Lorsque ces 2 conditions sont remplies, on peut espérer briser la tolérance immunitaire qui existe au niveau de la barrière intestinale.

En 1996, l'objectif de Debard N est de présenter la protéine SAG1 sous forme de microparticules, préparées avec des copolymères des acides D,L lactique et glycolique, de 10 microns afin de permettre un ciblage optimal et une capture par les cellules M des épithéliums folliculaires digestifs.

Les microsphères, composés ne présentant aucune toxicité et dont la nature influence la cinétique de libération de l'antigène, permettent d'induire des réponses spécifiques puissantes et prolongées dans de nombreux modèles d'immunisation, par exemple avec la protéine Sm28GST des schistosomes.

▪ Préparation de la formule SAG1/microsphères

La purification de l'antigène SAG1 est effectuée selon la technique de Kasper LH *et al*-1983. Son encapsulation dans des microsphères est réalisée par la méthode d'évaporation de solvant.

Un soin tout particulier a été apporté à la caractérisation des microsphères formées : leur aspect en microscope optique, leur taille, le taux encapsulation, la cinétique de libération et l'intégrité de la protéine SAG1 sont connus avec précision. Il est important de contrôler ces paramètres et de déterminer le degré de préservation de l'antigénicité de SAG1 durant le processus d'encapsulation. Les études par immunoempreinte de la protéine extraite des microsphères montrent que les conditions expérimentales n'ont pas modifiées ses propriétés.

- Résultats de l'immunisation

Les souris CBA/J ont été immunisées per os à l'aide d'une canule intragastrique avec 50 µg de SAG1 libre ou encapsulée, additionnée ou non de 10 µg de TC. Même avec deux rappels à dix jours d'intervalle, le complexe n'a pas montré d'effet immunogénique : aucune réponse IgG n'est visualisée sur les immunoempreintes des antigènes totaux des tachyzoïtes de la souche RH testés avec les sérums des souris immunisées.

- Conclusion

La voie orale présente un inconvénient majeur : cette voie exige une grande quantité d'antigènes, du fait de l'inactivation au niveau gastrique de la plus grande partie de la dose absorbée. D'autres voies sont donc explorées : la voie intranasale paraît particulièrement prometteuse.

- b. Antigènes administrés par voie nasale

L'immunisation par voie nasale est suivie d'un passage rapide de l'antigène à travers la muqueuse et de sa fixation sur des cellules dendritiques, analogues aux cellules de Langerhans, qui transportent l'antigène d'une part vers les ganglions lymphatiques de la chaîne carotidienne, d'autre part vers les végétations adénoïdes, formations lymphoïdes appartenant à l'anneau de Waldeyer. Une partie de l'antigène soluble passe dans la circulation sanguine, une autre dans le tube digestif.

❖ SAG1+TC

▪ Protocole

Les souris ont reçu à 2 reprises des doses de 5 µg de SAG1 seule ou additionnée de 0.5 µg de TC. Dans le but d'évaluer la mémoire à long terme une troisième dose a été administrée à J153.

▪ Réponse anticorps sérique

Dans les deux groupes expérimentaux, une seule administration par voie nasale a permis d'induire une forte réponse IgG spécifique de SAG1 au niveau sérique. La réponse est cependant 30 fois plus élevée à J27 chez les animaux du groupe SAG1+TC que chez ceux du lot SAG1. Le rappel pratiqué à J28 entraîne une augmentation nette du titre anti-SAG1 qui ne décroît que très légèrement jusqu'à la 3^{ème} immunisation. Durant cette période, les souris vaccinées avec SAG1+TC présentent des titres en moyenne 100 fois plus élevés que ceux du lot SAG1. Au deuxième rappel, le taux d'IgG anti-SAG1 du groupe SAG1 tend à rejoindre celui du lot SAG1+TC.

Une synthèse d'IgA spécifique de SAG1 est également mise en évidence. Elle se développe lors du premier rappel pour le groupe SAG1+TC et lors du second rappel pour le groupe SAG1.

Les profils des réponses spécifiques traduisent, par leur rapidité et par leur amplitude, la mise en place d'une mémoire immunitaire dès la première immunisation.

▪ IgA intestinale

Aucune réponse IgA anti-SAG1 n'est détectable dans les sécrétions intestinales des animaux immunisés par SAG1+TC après une seule immunisation. Une réponse apparaît lors d'une seconde immunisation mais ne se maintient pas à un niveau stable : le pic est atteint rapidement 10 jour après ce premier rappel puis diminue régulièrement jusqu'à J153, jour du second rappel. Dès lors, le titre d'anticorps IgA réaugmente mais se stabilise à des niveaux

inférieurs à celui obtenu lors de la deuxième vaccination. Le phénomène n'est pas propre à la toxoplasmose :

- chez certains parasites, des immunisations répétées induisent une augmentation non spécifique des IgAs, entravant l'établissement de la réponse spécifique. Ce n'est pas le cas ici car la réponse totale IgA à la 3^{ème} immunisation est comparable à celle obtenue au 2^{ème} rappel.
- la faiblesse de la réponse peut souvent s'expliquer par une primosensibilisation insuffisante.

Parmi le groupe SAG1, seul un animal a développé une réponse IgA intestinale spécifique. C'est donc la TC qui assure la mise en place d'une réponse locale à long terme vis-à-vis d'antigènes co-administrés. L'immunisation se traduit par une protection à court et long terme : 80 fois moins de kystes sont trouvés chez les souris immunisées à deux reprises et infectées 13 jours après le dernier rappel. La diminution de la charge parasitaire intracérébrale est également de l'ordre de 85% lorsque les souris sont immunisées à trois reprises (J0, J28, J153) et éprouvées 5 mois après.

Le déclin des IgA intestinales face au maintien simultané de la réponse sérique suggère que les IgA spécifiques présentes au niveau intestinale sont produites localement. Elles ne proviennent ni de la transsudation des IgA sériques ni de leur transport intraépithélial. Leur rôle dans la protection est révélé par les expériences de transfert : les lymphocytes isolés du lot SAG1 + TC confèrent aux animaux receveurs une protection modeste, de l'ordre de 35%.

▪ Conclusion

SAG1 n'a atteint les sites inducteurs de la réponse locale et systémique que grâce à l'emploi de la TC.

La toxine non mutée a des effets secondaires suffisamment importants pour être incompatible avec une utilisation large et les autres adjuvants habituellement utilisés chez l'animal sont difficilement utilisables chez l'homme. En réfléchissant à ce problème et à l'action de la TC, Fermin Z *et al*-1999 ont tenté d'apprécier l'intérêt que pourrait avoir l'emploi d'analogues d'AMPC ou de stimulateurs de l'adénylate cyclase. Ils ont pensé au salbutamol.

❖ SAG1+Salbutamol (Firmin Z *et al*-1999)

▪ Mode d'action

La ventoline, depuis sa mise sur le marché en 1991, est l'antiasthmatique le plus prescrit. Après inhalation, elle exerce une action stimulante des récepteurs β_2 du muscle lisse bronchique assurant ainsi une bronchodilatation importante et prolongée. Son action agoniste β adrénergique fait augmenter les niveaux d'AMPc.

▪ Résultats

Une protection de 60% contre un challenge oral avec 100 kystes de la souche 76K a été obtenue chez les souris immunisées avec 10 μ g de SAG1 associée à 100 μ g de salbutamol.

Cette protection partielle ne semble pas due à la réponse humorale puisque la réponse IgG n'est pas plus élevée que celle des souris du groupe témoin. Aucune IgA anti-SAG1 n'a été retrouvée dans les sécrétions intestinales et une prolifération des cellules spléniques n'a pas pu être provoquée *in vitro*.

Les chercheurs ont toutefois réussi à préciser le mécanisme adjuvant du salbutamol : il améliore la présentation antigénique. En raison de la difficulté à prélever des cellules dendritiques du NALT, une lignée de cellules spléniques a été utilisée. La présence d'un récepteur β adrénergique sur ces cellules a été prouvée *in vitro* par l'augmentation de l'AMPc sous salbutamol, accumulation bloquée par l'utilisation d'antagonistes β adrénergiques.

Lorsque les cellules dendritiques sont sensibilisées avec SAG1+salbutamol puis inoculées dans les coussinets des pattes des souris, la réponse proliférative des splénocytes à un extrait antigénique total est nettement plus élevée que dans le groupe traité par SAG1 seule. Par contre aucun relargage d'IFN- γ n'a été mis en évidence. Cette conclusion est la même que celle de Panina-Bordignon P *et al*-1997 : les agonistes β ont un effet inhibiteur sur la sécrétion d'IL-12 par les cellules dendritiques et orientent la réponse muqueuse vers un profil Th2. Ce profil muqueux est celui recherché et le fait que l'on n'observe pas d'IgAs est expliqué par un prélèvement trop précoce.

6. Vecteurs vivants

Les vecteurs vivants sont très efficaces et provoquent habituellement une réponse immunitaire de grande ampleur et de longue durée par rapport aux vecteurs non vivants.

Le transfert génétique est un domaine en pleine expansion : le gène d'intérêt peut être introduit dans un vecteur qui joue alors le rôle de transporteur permettant d'accéder aux cellules du système immunitaire.

a. Utilisation de CPA

Les cellules présentant l'antigène sont des cibles particulièrement attractives : elles sont relativement bien identifiées, cultivables *in vitro* et modifiables génétiquement.

L'équipe de Aosai F *et al*-1999 a inclus l'ADNc de SAG1 dans le vecteur pME18₁₀₀ et l'a transfecté par électroporation dans une cellule RMA.S. La cellule RMA.S est une CPA qui présente l'antigène aux CTL dans un modèle CMH I. La RMA.S employée est un mutant issu d'un lymphome de souris C57BL/6. Elle est déficiente en molécules TAP « transporter associated with antigen processing » responsables de la prise en charge du peptide du cytosol à la lumière du réticulum endoplasmique : les molécules de classe I du CMH fixent de manière prédominante les peptides dérivés du gène de SAG1 transfecté, contenant une séquence signal.

3 clones RMA.S/SAG1-1 ; RMA.S/SAG1-6 ; RMA.S/SAG1-16 ont été établis.

L'immunisation de souris C57BL/6 avec RMA.S/SAG1-1 (2 immunisations à 2 semaines d'intervalle) a permis de générer une lignée CTL CD8+. Ces cellules R/S-1 sont capables de lyser les 3 clones mais aussi des cellules RMA.S infectées. Les cellules transfectées expriment donc un épitope T qui est le même que celui présenté lors d'une infection.

Après un challenge de 10^4 tachyzoïtes RH, les souris immunisées par RMA.S infectées ont survécu plus de 21 jours. Toutes les souris immunisées par les RMA.S transfectées sont mortes. On a cependant obtenu une protection en baissant les doses de tachyzoïtes RH : 46% des souris résistent à une dose de 10^2 et 25% à une dose de 10^3 .

b. BCG

La possibilité d'utiliser des BCG recombinants est attrayante car :

- ces bactéries naturellement atténuées sont déjà utilisées sans risque : seulement quelques cas d'effets indésirables sévères sont rapportés sur un billion de vaccinations.
- ils possèdent un effet adjuvant intrinsèque : leur faire exprimer et délivrer un antigène à propriétés protectrices devrait donc additionner un effet spécifique et un effet non spécifique.

▪ Choix de l'antigène vaccinant

Parmi les ESA, GRA1 est le principal antigène reconnu par le sérum d'hommes et de moutons chroniquement infectés. La séquence d'ADN codant la protéine GRA1 mature (sans son peptide signal) a donc été amplifiée par PCR puis fusionnée avec le promoteur et le peptide signal de l'antigène 85A de *M. tuberculosis*. Le plasmide obtenu a été introduit dans le BCG par la méthode d'électroporation.

La protéine GRA1 a également été clonée dans *E. coli* et produite en tant que protéine de fusion avec la glutathion-S-transférase.

▪ Résultats d'immunogénicité chez la souris

L'administration intrapéritonéale de BCG recombinant à des souris OF1 ne produit pas de réponse anticorps anti-GRA1 même si 3 doses de 5×10^6 sont injectées. Par contre, des niveaux sont détectés si l'on utilise le BCG recombinant lors de la première injection et la protéine GRA1-GST comme rappel.

▪ Résultats de protection chez la souris

Le délai de mortalité chez les souris OF1 vaccinées à deux reprises par BCG recombinant est très similaire à celui observé chez les mêmes souris immunisées avec un virus de la vaccine produisant GRA1 (Cesbron-Delauw MF *et al*-1989). L'effet est très modeste. Une seule souris sur 8 a survécu plus de 60 jours à l'administration orale de 1000 kystes de la souche 76K. Pour les autres souris, le délai de mortalité n'est que très légèrement retardé.

Le manque de protection est certainement dû à l'insuffisance de production de GRA1. Ce protocole de vaccination a déjà été employé contre *S. mansoni* et s'est révélé positif. Pour ce parasite, de plus fortes réponses anticorps anti-Sm28GST ont été observées lorsqu'on utilise le promoteur hsp60 à la place du promoteur 85A. Le promoteur 85A ne serait donc pas assez puissant pour induire une réponse immune contre les antigènes qui sont produits sous son contrôle. Le fait que GRA1 ne soit détectée que lorsque les surnageants de cultures sont concentrés 60 fois va dans ce sens.

▪ Chez des agneaux

Les agneaux sont immunisés avec 10^9 BCG recombinants en sous-cutanée. Le rappel a lieu 12 semaines après avec 10^8 organismes injectés par voie intraveineuse.

Là encore, aucun anticorps anti-GRA1 n'a été décelé par ELISA ou la technique d'immuno-transfert. Par contre, une prolifération des PBM spécifiques de l'antigène a été détectée après la 2^{ème} immunisation. Ces PBM produisent de l'IFN- γ .

Après challenge oral avec des oocystes infectieux, les animaux immunisés montrent une élévation thermique qui est plus rapide et plus transitoire que le groupe sentinelle (2 jours au lieu de 5). Les animaux qui ont les meilleures réponses T anti-GRA1 sont ceux dont la fièvre dure le moins longtemps : la réponse plus rapide entraîne une période courte de parasitémie.

▪ Conclusion

- La voie d'administration et le modèle animal influencent le développement de la réponse immunitaire.

- Chez la souris, il serait utile de tester d'autres systèmes d'expression pour une présentation optimale de GRA1. Une aide peut être également fournie par co-administration de cytokines Th1. Tout récemment des souches de BCG produisant ces cytokines ont été décrites.

7. Vaccins ADN

La simplicité de sa mise au point, la facilité de sa mise en œuvre, sa remarquable efficacité font de l'immunisation génétique une méthode séduisante pour la confection de nouveaux vaccins.

Depuis 5 ans, le nombre de rapports sur l'utilisation de la vaccination par les acides nucléiques dans le cadre des infections parasitaires se multiplie. Les travaux les plus nombreux concernent les protozoaires et quatre publications traitent d'études sur les toxoplasmes. La technologie utilisée est celle de « l'ADN nu », non associé à des systèmes de transport : l'ADN purifié est injecté par voie intramusculaire, en solution saline, au moyen d'une seringue.

a. Vaccins ADN et toxoplasmose

❖ **Expérience de Nielsen HV *et al*-1999**

L'utilisation d'un plasmide à base de SAG1 nommé p1tPASAG1 est un excellent moyen de présenter au système immunitaire l'antigène parfaitement replié, possédant une conformation permettant l'induction d'anticorps anti-SAG1 et de CTL CD8+. Les études de protection ont permis d'estimer son efficacité protectrice entre 80% et 100% contre un challenge léthal de tachyzoïtes de la souche RH.

❖ **Expérience d'Angus CW *et al*-2000**

Le vecteur d'expression est un plasmide pCMVInt qui inclut la séquence codant pour le TPA (human tissue plasminogen activator). Le promoteur du CMV contrôle l'expression de la protéine de fusion TPA-SAG1.

Dans un premier temps, les chercheurs ont incorporé le plasmide dans des cellules humaines de rhabdomyosarcome (cellules RD) afin de vérifier la capacité du pCMVToxo à exprimer la protéine dans les cellules transfectées.

L'analyse par Western-blot a confirmé la présence d'une protéine réactive avec les anticorps anti-SAG1 et de poids moléculaire apparent de 34kDa. C'est une N-glycosylation qui est responsable de l'augmentation du PM et le traitement de la molécule par une endoglycosidase F permet d'obtenir une protéine identique à celle présente sur la membrane des tachyzoïtes.

Le protocole d'immunisation des souris C57BL/6 a consisté en trois injections intramusculaires de pCMVToxo associé à 50 µg de GM-CSF (Granulocyte-macrophage-colony stimulating factor). Les doses de rappel ont été effectuées trois et six semaines après la première injection.

Cette immunisation a permis d'induire des réponses immunes optimales :

- le titre en anticorps anti-SAG1, déterminé par la méthode ELISA, est très élevé. Des dilutions positives sont observées à partir de 1 : 5400.
- le rapport IgG1/IgG2a bas, de 0.81 ± 0.29 , caractérise une forte réponse Th1. Les expériences de restimulation *in vitro* par SAG1 confirment ce résultat : les splénocytes des souris immunisées produisent de l'IFN- γ et de l'IL-2 mais pas d'IL-4.

L'immunisation fournit une bonne protection contre une épreuve orale létale de kystes de la souche ME49. Des résultats positifs ont également été obtenus chez les rats infestés par des oocystes. La méthodologie de vaccination ADN est donc un outil particulièrement efficace, applicable contre les stades sporozoïte et bradyzoïte du toxoplasme, chez des différents hôtes.

❖ Potentiel protecteur des ESA (Desolme B *et al*-2000)

Un plasmide contenant le gène de GRA4 a engendré une protection de 62% contre une épreuve orale chez des souris C57BL/6. Ce résultat, plus faible que les précédents, peut s'expliquer par une réponse immunitaire moins polarisée vers le modèle Th1, associant des composantes immunologiques rattachées à la fois à des cytokines de type 1 (IFN- γ) et des cytokines de type 2 (IL-10). Il est possible de modifier cette réponse et d'améliorer la protection en utilisant un plasmide codant pour le GM-CSF.

❖ Expérience de Vercammen M *et al*-2000

Les résultats de vaccination sont étroitement liés au choix du modèle d'expérimentation. Parmi les espèces de souris C57BL/6, C3H, et BALB/c immunisées par des plasmides contenant GRA1, GRA7 et ROP2, seules les souris C3H ont été protégées vis-à-vis d'une épreuve orale. Dans ce cas, on a pu mettre en évidence les 3 types de réponses immunes que l'on peut attendre d'un vaccin idéal : réponse humorale, réponse T cytotoxique comparable à celle que l'on peut observer au cours de l'infection, réponse T auxiliaire de profil Th1 caractérisée, entre autre, par la production d'IFN- γ par les cellules T spécifiquement activées et accompagnée de la production d'immunoglobulines d'isotype dominant IgG2a par les lymphocytes B.

b. Perspectives

La vaccination ADN s'est donc imposée comme une option réaliste, adaptée au contrôle d'infections parasitaires intracellulaires comme la toxoplasmose. Elle induit des réponses immunitaires élargies, peut s'accompagner de nombreuses possibilités d'immunomodulation et permet, en théorie, de contrôler le site d'expression de l'antigène. Dans le cas de *T. gondii*, il serait intéressant d'utiliser ces propriétés pour la mise en place de réponses immunes à composantes locales et systémiques c'est-à-dire tenter une vaccination par voie muqueuse à l'aide de fragments d'ADN nus ou associés à divers vecteurs. Une telle approche, réussie au niveau intestinal, permettrait de détecter une intrusion du parasite dès son entrée. On sait également que ce site joue un rôle directement effecteur dans l'élimination du parasite.

c. Conclusion

La recherche vaccinale contre *T. gondii* s'est révélée exceptionnellement difficile. Malgré des efforts importants, il n'a pas encore été possible de mettre au point un vaccin efficace pouvant être utilisé chez l'homme.

On commence néanmoins à mieux appréhender les stratégies possibles : le but est d'induire une forte réponse T protectrice en évitant la stimulation de cellules T suppressives ou inductrices de phénomènes immuno-pathologiques.

L'objectif immunologique à atteindre paraît accessible en utilisant la vaccination génétique. En science, il est vraiment inhabituel pour une simple idée novatrice d'être acceptée aussi rapidement : la première démonstration d'une immunité protectrice induite par vaccination ADN fut faite par Ulmer *et al* en 1993 et depuis, un nombre considérable de travaux ont été publiés illustrant dans différents modèles l'efficacité de cette technique à induire une réponse immunitaire spécifique contre des agents infectieux. Toutes ces expérimentations ne doivent pas faire naître d'espairs inconsidérés. Le recul est trop faible pour pouvoir tirer des conclusions définitivement favorables. La vaccination génique n'aura un impact majeur sur la santé humaine qu'après le développement de nombreuses garanties sur l'absence de risque de telles procédures de vaccination.

II. ANIMAUX D'ELEVAGE

La souris est un excellent modèle d'étude des mécanismes immunitaires mais elle ne reproduit en rien l'infection humaine.

1. La brebis

Du point de vue de la santé publique et du point de vue économique, l'espèce la plus affectée par la toxoplasmose est le mouton (Esteban-Redondo I *et al*-1997 ; Buxton D-1998). L'impact économique de la toxoplasmose ovine est important en Nouvelle-Zélande, en Australie et en Grande-Bretagne, pays de grands élevages ovins.

En Nouvelle-Zélande et Norvège, la toxoplasmose ovine est la première cause d'avortement due à une maladie infectieuse et dans certaines zones de Grande-Bretagne, elle cause plus de dégâts que l'avortement par chlamydiae. Aucun médicament n'est recommandé en usage vétérinaire et le diagnostic de l'infection n'est pas rentable économiquement

L'étude de la maladie chez des brebis en gestation n'a pas seulement une importance du point de vue économique, c'est un modèle adapté pour l'étude de l'infection humaine.

a. Essais de vaccinations

- Des tachyzoïtes inactivés utilisés seuls (Beverley JK *et al*-1971) ou en association à l'adjuvant incomplet de Freund (Wilkins MF *et al*-1987) n'ont aucun effet protecteur.
- Des antigènes de surface combinés à du Quil A dans des ISCOMs ont donné des résultats prometteurs chez la souris. Chez la brebis, cette préparation fournit une bonne réponse anticorps mais la stimulation est insuffisante pour déclencher les mécanismes immunitaires protecteurs. Ceci prouve combien il est difficile d'extrapoler des résultats d'une espèce à une autre (Overnes G *et al*-1991 ; Lunden A-1995).
- En 1988, un vaccin vivant «Toxovax, New Zealand Ministry of Agriculture and Fisheries » a été mis sur le marché en Nouvelle-Zélande et après des évaluations poussées, a été lancé en Eire et au Royaume-Uni. « Toxovax, Mycofarm UK Ltd ».

b. Toxovax (Buxton D-1995)

❖ Composition et mode d'emploi

Le vaccin est constitué de tachyzoïtes de la souche S48, lignée incomplète, isolée après injection à des souris d'un inoculum dérivé de membranes fœtales issues d'un agneau abortif. Les tachyzoïtes ont été maintenus par passage bi-hebdomadaire chez la souris. Après plus de 3000 passages, le parasite a perdu sa capacité à former des kystes et à donner des oocystes chez les chats.

Les tachyzoïtes vivants sont concentrés dans une suspension aqueuse qui doit être diluée au moment de l'emploi. La dose est de 2 ml par animal, le site d'injection se situe au ras du cou.

❖ Précautions d'emploi

Des recommandations strictes sont à respecter :

- vacciner le troupeau entier 3 semaines avant l'accouplement,
- ne faire qu'une injection sous-cutanée,
- manipuler le vaccin avec précaution afin d'éviter tout risque de contamination humaine.

❖ Propriétés

- Après injection, le parasite se multiplie dans le tissu lymphoïde local, causant une réponse fébrile 5 à 10 jours plus tard. Durant cette période, les tachyzoïtes sont présents dans le sang.
- Les anticorps apparaissent 11 jours après la contamination, atteignent leur maximum au bout de 6 semaines et diminuent ensuite progressivement pendant 14 semaines. Chez les brebis vaccinées avec la souche complète, les titres restent élevés pendant plusieurs mois : ils sont dus à la présence du parasite dans les tissus. La souche S48, elle, ne persiste pas dans l'organisme hôte et est indétectable 6 semaines après l'infection (Wastling JM *et al*-1995).

❖ Inconvénients

Le demande saisonnière et la durée de vie courte du vaccin pose des problèmes logistiques dans la production.

❖ Efficacité de « Toxovax »

▪ En conditions naturelles

Le vaccin a été testé en vaccinant la moitié des femelles de 101 troupeaux : 20 troupeaux ont été exposés à la toxoplasmose et le nombre d'avortements a été réduit chez les femelles vaccinées (Spence JA *et al*-1992).

▪ En conditions contrôlées

Pour établir de façon définitive l'efficacité du Toxovax, il est apparu nécessaire de réaliser un nouvel essai prospectif et randomisé. Cet essai a été conduit chez 63 brebis séronégatives par méthode ELISA pour les anticorps IgG. 18 mois après leur vaccination, les brebis ont été divisées en 3 groupes dans un environnement où les risques de toxoplasmose naturelle sont pratiquement nuls :

- le premier groupe a reçu une dose de 2000 oocystes par voie orale à 90 jours de gestation,
- le 2^{ème} lot n'a pas été vacciné,
- le groupe n° 3 sert de contrôle.

Plusieurs critères ont été examinés :

	Groupe 1	Groupe 2
% d'agneaux vivants et viables	80	11
% d'avortements	10	77
% d'agneaux morts-nés	0	11
Durée de la gestation (jours)	142	117
Présence d'IgG chez les agneaux	33 %	100 %
Présence d'IgM chez les agneaux	1.56 %	100 %
Pathologie du placenta	Présente dans 44 % des cas réduite	Chez 100 % des brebis sévère

Le degré de protection est identique à celui obtenu 6 mois après la vaccination.

D'autres constatations ont été faites :

- les lésions observées chez les avortons de brebis non immunisées se situent au niveau du placenta et du fœtus. La placenta montre des cotylédons inflammatoires et nécrosés ; la lésion caractéristique se présente sous forme de nodules blanchâtres isolés ou confluents.

- chez certaines brebis vaccinées, une infection du placenta ou du fœtus a eu lieu mais n'a conduit qu'à des dégâts mineurs.

- toutes les brebis du groupe 1 montrent une fièvre plus précoce et plus brève que celle du groupe 2. Cette différence est liée au fait que la libération des facteurs pyrogènes est plus rapide et reflète la mobilisation d'une réponse immune protectrice au niveau des ganglions mésentériques.

Cette étude a montré que l'infection des moutons avec une souche non persistante induit une protection de longue durée contre un challenge sévère. Une seule injection est donc suffisante car un grand nombre d'animaux seront exposés à l'infection naturelle, et la stimulation antigénique qui en résulte augmentera l'immunité vaccinale

La mémoire immunologique demeure en l'absence de persistance d'antigènes et en dépit du faible taux d'anticorps.

Ceci pose des questions concernant la nature de cette mémoire immunologique. Deux hypothèses ont été suggérées :

- la maintenance d'un pool de cellules T nécessite la stimulation continue par des antigènes,
- les cellules T mémoire sont dotées d'une durée de vie longue et ne nécessitent pas de stimulation antigénique itérative.

En ce qui concerne le cas qui nous intéresse, c'est la deuxième théorie qui semble la plus plausible.

❖ Immunité chez la brebis

Pour étudier la réponse immune plus en détail, le canal lymphatique efférent du ganglion lymphatique préfomoral a été canulé et la lymphe collectée (Buxton D *et al*-1994).

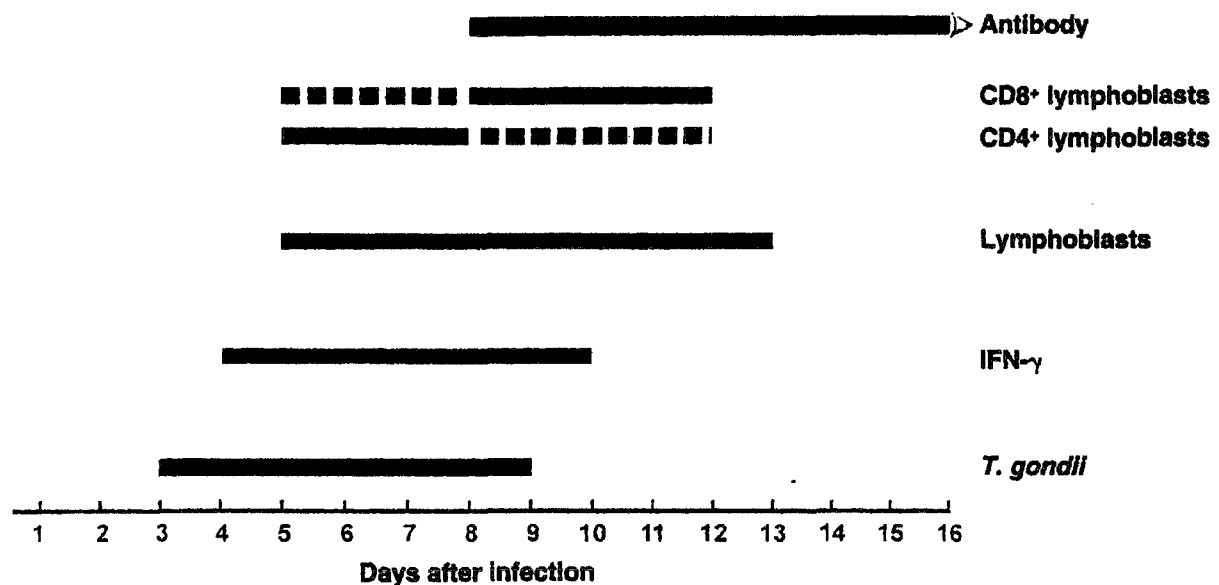


Figure 19 : Réponses immunes chez la brebis lors d'une primo-infection avec la souche S48

La primo-infection produit une augmentation des cellules : le maximum est atteint à J11 ou J12 et 40% des cellules sont alors des lymphoblastes. La majorité des lymphoblastes sont des cellules T. La population dominante est composée initialement de CD4+. Les CD8+ deviennent majoritaires lorsque la réponse cellulaire atteint son pic à J9-10, (Innes EA *et al*-1995). L'IFN- γ est détecté de J3 à J10.

Un challenge chez des brebis vaccinées 12 mois plus tôt résulte en une augmentation très rapide du rendement cellulaire (pic à J5 où 20% des cellules sont des blastes). La production d'IFN- γ subit une accélération 24 h après l'infection. Aucune dissémination du parasite n'est détectable. Les auteurs concluent que la protection est conférée par les CD4+, CD8+ et l'IFN- γ .

❖ Conclusion

Bien que le vaccin ne soit pas approprié à l'usage humain, la manière dont il induit une immunité chez la brebis est essentielle pour la compréhension des mécanismes immuns : on a pu constater que les cellules CD4+ et CD8+ jouent un rôle pivot dans les réponses immunes et que de l'IFN- γ est produit.

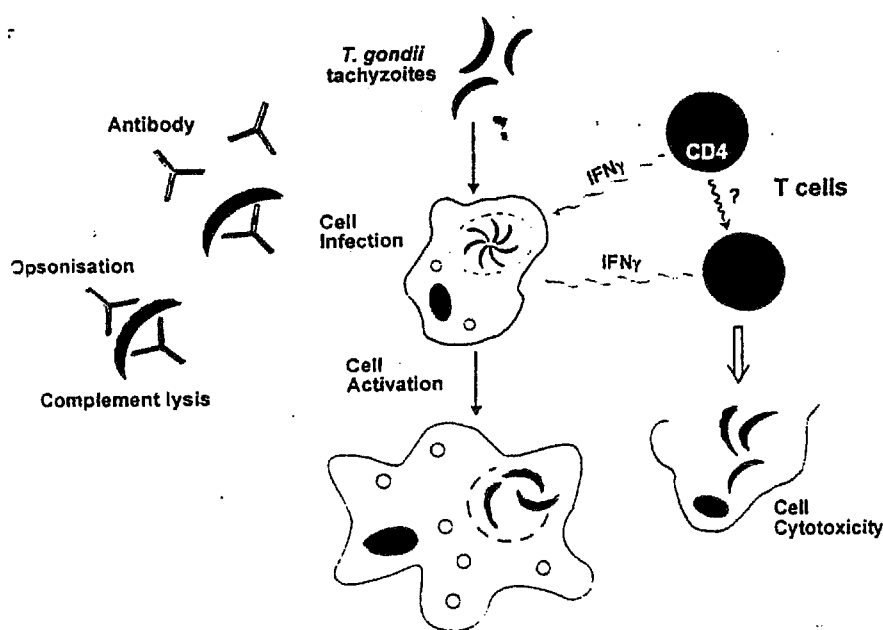


Figure 20 : Réponses immunes chez la brebis

2. Le porc

Expérimentalement, l'infection des porcs adultes est en général subclinique par ingestion de kystes, plus grave par ingestion d'oocystes. La toxoplasmose congénitale est peu fréquente, et plusieurs expériences ont montré que l'on pouvait, par ingestion d'oocystes, infecter les truies sans infecter les fœtus. Néanmoins, l'infection naturelle existe : plusieurs épidémies de toxoplasmose acquise ont été signalées, déterminant de la pneumonie et de l'encéphalite chez les porcelets à la mamelle et des avortements chez les truies.

La toxoplasmose porcine est économiquement importante au Japon et motive les chercheurs à étudier l'immunité anti-toxoplasmique dans cette espèce. L'équipe de Dubey JP s'est spécialisée dans ce domaine de recherche.

Leurs résultats expérimentaux présentent des variations importantes selon les voies d'administration, les souches et les stades de toxoplasmes.

a. Utilisation de tachyzoïtes vivants de la souche RH (Pinckney RD *et al*-1994)

- L'injection intraveineuse chez de très jeunes porcelets (3 jours) se traduit par une maladie sévère. Les manifestations cliniques sont polymorphes et non spécifiques : dyspnée, inactivité, diarrhées, anorexie, perte de poids... Des lésions microscopiques sont présentes dans de nombreux tissus notamment au niveau neurologique, oculaire, digestif et pulmonaire. Les résultats sont les mêmes si des cochons plus âgés (3 mois) sont infectés.

- La voie sous-cutanée, elle, ne provoque pratiquement pas de lésions tissulaires mais ne peut pas être utilisée en vaccinologie car des tuméfactions, des érythèmes et des ulcères sont présents au site d'inoculation.

- L'inoculation par voie intramusculaire est sans danger. L'étude histologique des tissus prouve que la souche persiste dans l'organisme des porcs : des tachyzoïtes viables sont retrouvés 14 jours après la vaccination.

Elle provoque une immunité protectrice contre un challenge oral de 10^5 oocystes. A part la fièvre, tous les cochons sont cliniquement normaux. Trois jours après le challenge, la concentration en *T. gondii* est réduite de 100,000 fois au niveau des ganglions lymphatiques mésentériques par rapport aux non vaccinés.

b. Utilisation de ts-4 (Dubey JP *et al*-1994)

Les résultats présentés sont comparables à ceux obtenus chez la brebis avec la souche S48 : les toxoplasmes sont capables d'envahir l'organisme hôte mais n'y persistent pas. Ils sont éliminés d'une manière drastique et à partir du 17^{ème} jour, il n'y a plus d'isolement possible. De ce fait, aucun des cochons ne développe de signes cliniques de maladie et aucune lésion microscopique n'est visible. L'efficacité de la vaccination par ts-4 a été examinée après challenge oral avec des oocystes. Les porcelets étant plus sensibles à l'infection que les adultes, il est nécessaire de soumettre l'animal à plusieurs expositions pour avoir une protection significative (doses vaccinales : 3×10^5 tachyzoïtes à J3 de naissance ; dose de rappel : 3×10^5 tachyzoïtes à J17)

c. Utilisation d'oocystes irradiés (Dubey JP *et al*-1997)

Des oocystes sont inactivés par des irradiations γ de 0.3 ou 0.4 kGy provenant d'une source de césium 137 et sont introduits dans la nourriture de cochons âgés de 2 à 3 mois. Trois mois plus tard, 15 cochons sont infectés par une dose orale importante (10^5 à 10^6) d'oocystes et 7 subissent un challenge de faible importance (10^2 à 10^3). Tous les cochons sont restés en bonne santé mais la vaccination n'a pas prévenu la formation de kystes tissulaires.

Parmi le groupe témoin de cochons non immunisés, tous ceux ayant reçu de grosses doses d'oocystes sont malades, le début des symptômes se situant 4 à 5 jours après le challenge. Pour les doses faibles, aucune différence significative du point de vue clinique ne permet de différencier ce groupe du groupe vacciné. Néanmoins, l'analyse de différents tissus, langue, diaphragme et cerveau met en évidence des charges kystiques plus basses chez les cochons vaccinés.

III. LE CHAT

Le chat occupe une place toute particulière dans le cycle évolutif de *T. gondii*, puisqu'il est un hôte complet, à la fois définitif et intermédiaire.

La fréquence de la toxoplasmose est en liaison avec l'abondance des chats dans les pâturages. Un petit nombre de chats suffit à contaminer une prairie en un temps très court, puisqu'un animal peut éliminer des millions d'oocystes après ingestion d'une seule souris infectée. En conséquence, afin d'éviter aux animaux pâturant au voisinage des fermes d'ingérer les oocystes rejetés des matières fécales de chats, on a pensé à vacciner les chats.

1. Expérience de Freyre A-1993

La souche T-263 est un mutant kystogène, qui a perdu la capacité de former des oocystes chez le chat : 84% des chats immunisés par voie orale avec des kystes ou des bradyzoïtes de la souche T-263 puis infectés oralement ne produisent pas d'oocystes.

Les tachyzoïtes, même s'ils sont délivrés directement dans la cavité péritonéale, ne sont pas protecteurs : malgré leur séroconversion et leur titre élevé en anticorps, 5 chats sur 7 libèrent des oocystes.

a. Efficacité du vaccin

Elle a été confirmée par la publication récente d'une étude menée sur une période de 3 ans dans 8 fermes spécialisées dans l'élevage de porcs en Illinois.

▪ But de l'étude

Connaître la répercussion d'un vaccin administré chez le chat sur le taux de porcs contaminés.

▪ Protocole

Les chats ont été capturés et vaccinés oralement en 1994 et 1995.

Des échantillons ont été collectés une fois par année en 1994, 1995 et 1996. A chaque visite, on a prélevé : le sang des chats, des cochons et des souris pour le dosage d'anticorps, les fèces des chats pour la détection des oocystes, des tissus musculaires et cardiaques de souris pour la recherche des kystes.

▪ Résultats

A la première capture, les réactions sérologiques ont été négatives chez 72.6% des chats jeunes et 32.6% des chats adultes. Parmi ces chats, 58.1% des chats adultes et 45.9% des chats jeunes ont été recapturés et ont reçu une seconde dose de vaccin en 1995.

La prévalence de libération d'oocystes a été évaluée à partir de 1992 jusqu'en 1996 : 5% des chats ont éliminés des oocystes entre 1994 et 1996 dont 90.1% en 1994. La dernière détection d'oocyste a été faite lors de la première visite de 1995.

Une corrélation a été trouvée entre le changement de prévalence des chats juvéniles et le nombre de cochons contaminés : l'exposition réduite des porcs à *T. gondii* est le résultat de l'administration du vaccin aux chats. Cette conclusion est cohérente avec les chiffres obtenus chez les rongeurs : l'isolement des kystes tissulaires diminue progressivement (1.1% en 1994, 0,8% en 1995 et 0.5% en 1996) et la fréquence de séropositivité des examens sérologiques passe de 4% en 1992-1993 à 0% en 1996.

b. Conclusion

L'intérêt de cette vaccination est de diminuer la contamination de l'environnement par les oocystes et ainsi, de réduire le risque de transmission, notamment aux herbivores et à l'homme.

Elle est confrontée à deux problèmes majeurs : l'obtention de bradyzoïtes en quantité suffisante et la vaccination de l'ensemble des chats y compris les chats errants.

IV. CONCLUSION

La toxoplasmose, parasitose ubiquitaire opportuniste, a été l'objet de nombreuses recherches du fait de son extrême gravité chez le sujet immunodéprimé. Les formes cliniques particulièrement sévères chez le sujet atteint du SIDA et les résistances aux traitements orientent vers d'autres systèmes de protection.

Cette zoonose offre aux chercheurs un terrain de prédilection avec des modèles animaux qui peuvent être à la base d'applications de méthodes vaccinales intéressantes dans un premier temps pour leur impact économique pour le cheptel et dans un deuxième temps pour leur répercussion en santé humaine.

La mise au point d'un vaccin efficace, dépourvu de risque et assurant une protection de longue durée reste encore utopique dans le contexte des prophylaxies vis à vis des eucaryotes.

Néanmoins, plusieurs stratégies utilisant différents candidats vaccins ont donné des résultats prometteurs.

Les essais les plus encourageants ont été obtenus après administration parentérale de souches parasitaires incomplètes, ayant perdu la capacité d'établir un portage chronique. De telles souches peuvent être utilisées pour un usage vétérinaire mais leur utilisation en médecine humaine n'est pas souhaitable en raison des risques potentiels de réversion vers un caractère virulent.

Ceci explique la recherche de vaccins sous-unitaires, composés d'antigènes définis. La protéine P30, particulièrement intéressante, a été testée dans nombreuses études. L'utilisation d'adjuvants comme l'IL-12, les liposomes ou la saponine Quil A a permis d'améliorer l'efficacité de l'immunisation et, par conséquent, le degré de protection.

Les projets de vaccins basés sur la voie muqueuse sont également des concepts très attractifs. Des essais de vaccination par voie orale chez les lignées de souris les plus sensibles à la toxoplasmose, avec de l'antigène total de toxoplasme associé à de la toxine cholérique à des concentrations subtoxiques, induisent des protections de 50%, appréciées par la baisse du taux de mortalité et la diminution très importante du nombre de kystes dans le cerveau.

La tendance actuelle est à l'expérimentation des vaccins ADN. L'attrait de la nouveauté, l'argument économique (possibilité de produire un vaccin à faible coût) et l'efficacité de cette technique à induire une réponse immunitaire spécifique ne doivent pas faire oublier que le recul est insuffisant pour pouvoir tirer des conclusions définitivement favorables.

De réels progrès ont donc été accomplis et un objectif pratique a été atteint : le vaccin « Toxovax », destiné aux ovins, est commercialisé en Nouvelle-Zélande, en Irlande et en Grande-Bretagne. Toutes les recherches laissent présager la mise au point d'autres préparations utilisables dans le contexte vétérinaire.

Cependant, les résultats sont encore trop peu satisfaisants dans l'acquisition d'une immunité protectrice durable et totalement efficace. Il faut donc admettre que l'application aux populations humaines reste une échéance très lointaine.

THESE SOUTENUE PAR : **Sophie DUNAND**

TITRE : **Vaccination contre la toxoplasmose : réalités et perspectives**

CONCLUSION

La littérature très abondante concernant la toxoplasmose murine expérimentale se révèle un excellent modèle pour l'étude des différentes populations cellulaires, des cytokines et de leurs mécanismes d'action en réponse aux agents pathogènes à développement intracellulaire en général. Il est actuellement clairement établi que la résolution de l'infection est médiée par une réponse de type Th1 dont les cytokines IFN- γ et TNF- α activent les mécanismes toxoplasmicides des macrophages.

Les concepts nouveaux de l'immunologie, combinés aux bases moléculaires, ont permis de faire évoluer les approches vaccinales. Les travaux n'en sont plus à l'empirisme qui prévalait aux premiers temps du BCG.

De réels progrès ont été accomplis et un objectif pratique a été atteint en médecine vétérinaire : le vaccin « Toxovax » est commercialisé depuis plus de 10 ans dans les pays de grands élevages ovins (Nouvelle-Zélande, Eire et Royaume-Uni). Si ce vaccin participe de manière majeure à l'économie de la santé animale, il joue surtout un rôle en médecine comparée, dans la connaissance des mécanismes immunitaires. Prévenir la maladie animale n'a malheureusement pas permis de progresser par la suite dans la prévention de la toxoplasmose chez l'homme.

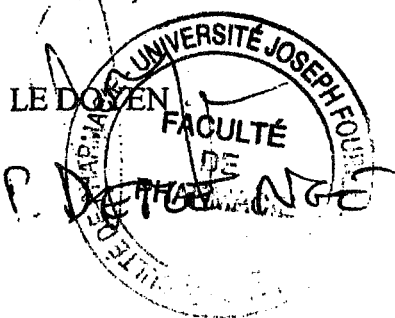
Il faut admettre que l'application aux populations humaines reste une échéance très lointaine. L'essentiel du problème réside dans l'incapacité des candidats vaccins à développer une immunité complètement stérilisante. Cet objectif, jamais atteint dans une autre vaccination, est probablement utopique.

Nouveaux adjuvants (liposomes, ISCOMs, IL-12...) protéines recombinantes, peptides linéaires ou MAP, insertion de gènes dans un vecteur atténué, immunisation muqueuse ou génique à l'aide d'ADN nu plasmidique : tous les nouveaux modes de présentation produits récemment par la recherche en vaccinologie ont été essayés sans succès chez la souris.

De plus, la recherche vaccinale contre la toxoplasmose ne bénéficie ni d'un soutien prioritaire de la recherche publique, ni de l'intérêt de la recherche industrielle. Il est clair que le parasite, malgré les dommages qu'il peut causer chez les individus immunodéprimés, la femme enceinte séronégative et dans les élevages ovins, est loin de constituer une menace sanitaire ou économique. En matière de vaccination, le grand défi vient aujourd'hui des virus et les recherches sur le VIH reste la préoccupation majeure.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER

Grenoble, le



LE DIRECTEUR DE THESE

Claudine Pinel

REFERENCES

- Adams LB, Hibbs JB, Taintor RR, Krahenbuhl JL. Microbiostatic effect of murine activated macrophages for *Toxoplasma gondii*. Role for synthesis of inorganic nitrogen oxides from L-arginine. *J Immunol*. 1990, **144** : 2725.
- Akbari O, Panjwani N, Garcia S, Tascone R, Lowrie D, Stockinger B. DNA vaccination : transfection and activation of dendritic cells as key events for immunity. *J Exp Med*. 1999, **189** : 169-177.
- Amichay D, Gazzinelli RT, Karupiah G, Moench TR, Sher A, Farber JM. Genes for chemokines MuMig and Crg-2 are induced in protozoan and viral infections in response to IFN-gamma with patterns of tissue expression that suggest nonredundant roles *in vivo*. *J Immunol*. 1996, **157** : 4511-4520.
- Angus CW, Klivington-Evans D, Dubey JP, Kovacs JA. Immunization with a DNA plasmid encoding the SAG1 (P30) protein of *Toxoplasma gondii* is immunogenic and protective in rodents. *J Infect Dis*. 2000, **181** : 317-324.
- Aosai F, Mun HS, Norose K *et al*. Protective immunity induced by vaccination with SAG1 gene-transfected cells against *Toxoplasma gondii*-infection in mice. *Microbiol Immunol*. 1999, **43** : 87-91.
- Bessieres MH. Règles d'interprétation de la sérologie de la toxoplasmose acquise. *Rev Fr Lab*. 1988, **178** : 65-69.
- Bessieres MH, Roques C, Berrebi A, Barre V, Cazaux M, Seguela JP. IgA antibody response acquired and congenital toxoplasmosis. *J Clin Pathol*. 1992, **45** : 605-608.
- Beverley JK, Archer JF, Watson WA, Fawcett AR. Trial of a killed vaccine in the prevention of ovine abortion due to toxoplasmosis. *Br Vet J*. 1971, **127** : 529-535.
- Bliss SK, Marshall AJ, Zhang Y, Denkers EY. Human polymorphonuclear leukocytes produce IL-12, TNF-alpha, and the chemokines macrophage-inflammatory protein-1 alpha and -1 beta in response to *Toxoplasma gondii* antigens. *J Immunol*. 1999, **162** : 7369-75.
- Bliss SK, Zhang Y, Denkers EY. Murine neutrophil stimulation by *Toxoplasma gondii* antigen drives high level production of IFN-gamma-independent IL-12. *J Immunol*. 1999, **163** : 2081-2088.
- Bohne W, Gross U, Heesemann J. Induction of bradyzoite-specific *Toxoplasma gondii* antigens in gamma-interferon-treated mouse macrophages. *Infect Immun*. 1993, **61** : 1141-1145.

Bohne W, Heesemann J, Gross U. Reduced replication of *Toxoplasma gondii* is necessary for induction of bradyzoite specific antigens : a possible role for nitric oxide in triggering stage conversion. *J Immunol.* 1994, **62** : 1761.

Bourguin I, Charde T, Mevelec MN, Woodman JP, Bout D. Amplification of the secretory IgA response to *Toxoplasma gondii* using cholera toxin. *FEMS Microbiol Lett.* 1991, **65** : 265-271.

Bourguin I, Charde 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** : 2082-2088.

Brown CR, McLeod R. Class I MHC genes and CD8+ T cells determine cyst number in *Toxoplasma gondii* infection. *J Immunol.* 1990, **145** : 3438-3441.

Brunda MJ. Interleukin-12. *J Leukoc Biol.* 1994, **55** : 280-288.

Bulow R, Boothroyd JC. Protection of mice from fatal *Toxoplasma gondii* infection by immunization with p30 antigen in liposomes. *J Immunol.* 1991, **147** : 3496-3500.

Burg JL, Perelman D, Kasper LH, Ware PL, Boothroyd JC. Molecular analysis of the gene encoding the major surface antigen of *Toxoplasma gondii*. *J Immunol.* 1988, **141** : 3584.

Buxton D, Thomson K, Maley S, Wright S, Bos HJ. Vaccination of sheep with a live incomplete strain (S48) of *Toxoplasma gondii* and their immunity to challenge when pregnant. *Vet Rec.* 1991, **129** : 89-93.

Buxton D, Thomson KM, Maley S, Wright S, Bos HJ. Experimental challenge of sheep 18 months after vaccination with a live (S48) *Toxoplasma gondii* vaccine. *Vet Rec.* 1993, **133** : 310-312.

Buxton D, Innes EA. A commercial vaccine for ovine toxoplasmosis. *Parasitology.* 1995, **110** Suppl : S11-6.

Buxton D. Protozoan infections (*Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Sarcocystis* spp.) in sheep and goats: recent advances. *Vet Rec.* 1998, **29** : 289-310.

Buzoni-Gatel D, Lepage AC, Dimier-Poisson IH, Bout DT, Kasper LH. Adoptive transfer of gut intraepithelial lymphocytes protects against murine infection with *Toxoplasma gondii*. *J Immunol.* 1997, **158** : 5883-5889.

Buzoni-Gatel D, Debbabi H, Moretto M, Dimier-Poisson IH, Lepage AC, Bout DT, Kasper LH. Intraepithelial lymphocytes traffic to the intestine and enhance resistance to *Toxoplasma gondii* oral infection. *J Immunol.* 1999, **162** : 5846-5852.

Byrd TF, Horwitz MA. Interferon-gamma-activated human monocytes downregulate transferrin receptors and inhibit the intracellular multiplication of *Legionella pneumophila* by limiting the availability of iron. *J Clin Invest.* 1989, **83** : 1457.

Candolfi E, Hunter CA, Remington JS. Mitogen- and antigen-specific proliferation of T cells in murine toxoplasmosis is inhibited by reactive nitrogen intermediates. *Infect Immun.* 1994, **62** : 1995-2001.

Candolfi E, Hunter CA, Remington JS. Roles of gamma interferon and other cytokines in suppression of the spleen cell proliferative response to concanavalin A and toxoplasma antigen during acute toxoplasmosis. *Infect Immun.* 1995, **63** : 751-6.

Carmickael C. Prevention and treatment of common HIV associated opportunistic complications. *HIV/AIDS management in office practice primary care.* 1997, **24** : 561-574.

Casares S, Inaba K, Brumeanu TD, Steinman RM, Bona CA. Antigen presentation by dendritic cells after immunization with DNA encoding a major histocompatibility complex class II-restricted viral epitope. *J Exp Med.* 1997, **186** : 1481 -1486.

Cesbron-Delauw MF, Pierce RJ, Torpier G *et al.* A strategy for cloning potential protective antigens of *Toxoplasma gondii*. In : Ginsberg H, Lerner RA, Chanock RM, Brown F, editors. *Vaccines*, **87**. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989, p155.

Cesbron-Delauw MF, Capron A. Excreted/secreted antigens of *Toxoplasma gondii*--their origin and role in the host-parasite interaction. *Res Immunol.* 1993, **144** : 41-44.

Cesbron-Delauw MF. Dense-granule organelles of *Toxoplasma gondii* : their role in the host-parasite relationship. *Parasitology Today.* 1994, **10** : 293-296.

Chan J, Siegel JP, Luft BJ. Demonstration of T-cell dysfunction during acute toxoplasma infection. *Cell Immunol.* 1986, **98** : 422-33.

Channon JY, Kasper LH. *Toxoplasma gondii*-induced immune suppression by human peripheral blood monocytes: role of gamma interferon. *Infect Immun.* 1996, **64** : 1181-1189.

Chao CC, Anderson WR, Hu S, Gekker G, Martella A, Peterson PK. Activated microglia inhibit multiplication of *Toxoplasma gondii* via nitric oxide mechanism. *Clin Immunol Immunopathol.* 1993, **67** : 178.

Charles T, Bourguin I, Mevelec MN, Dubremetz JF, Bout D. Antibody responses to *T. gondii* in sera, intestinal secretions, and milk from orally infected mice and characterization of target antigens. *Infect Immun.* 1990, **58** : 1240-1246.

Charles T, Velge-Roussel F, Mevelec MN, Blaise F, Bout D. Local and systemic cellular immunity following oral infection of mice with *Toxoplasma gondii* cysts. *Ann Rech Vet.* 1992, **23** : 290-291.

Charles T, Velge-Roussel F, Mevelec P, Mevelec MN, Buzoni-Gatel D, Bout D. Mucosal and systemic cellular immune responses induced by *Toxoplasma gondii* antigens in cyst orally infected mice. *Immunology.* 1993, **78** : 421-429.

Charles T, Bout D. Mucosal immune response in toxoplasmosis. *Res Immunol.* 1993, **144** : 57-60.

Chardes T, Buzoni-Gatel D, Lepage A, Bernard F, Bout D. *Toxoplasma gondii* infection induces specific cytotoxic CD8 α / β ⁺ Thy-1⁺ gut intraepithelial lymphocytes, lytic for parasite-infected enterocytes. *J Immunol.* 1994, **153** : 4596-4603.

Cheng L, Ziegelhoffer PR, Yang NS. *In vivo* promoter activity and transgene expression in mammalian somatic tissues evaluated by using particle bombardment. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993; **90** : 4455-9.

Chevallier A. Système lymphoïde muqueux. In : N Genetet, *Immunologie* 3^{ème} Eds : 113-120.

Chow YH, Huang WL, Chi WK, Chu YD, Tao MH. Improvement of hepatitis B virus DNA vaccines by plasmids coexpressing hepatitis B surface antigen and interleukin-2. *J Virol.* 1997, **71** : 169-178.

Clerici M, Stocks N, Zajac R *et al.* Detection of three distinct patterns of T helper cell dysfunction in asymptomatic, human immunodeficiency virus-seropositive patients. *J Clin Invest.* 1989, **84** : 1892-1899.

Clerici M, Shearer GM. A TH1 to TH2 switch is a critical step in the etiology of HIV infection. *Immunol Today.* 1993, **14** : 107-111.

Couvreux J, Desmonts G, Aron-Rosa D. Le pronostic oculaire de la toxoplasmose congénitale, rôle du traitement. *Ann Pediatr.* 1984, **31** : 855-858.

Curiel TJ, Krug EC, Purner MB, Poignard P, Berens RL. Cloned human CD4⁺ cytotoxic T lymphocytes specific for *Toxoplasma gondii* lyse tachyzoite-infected target cells. *J Immunol.* 1993, **151** : 2024-31.

Darcy F, Deslee D, Santoro F *et al.* Induction of a protective antibody-dependent response against toxoplasmosis by *in vitro* excreted/secreted antigens from tachyzoites of *Toxoplasma gondii*. *Parasite Immunol.* 1988, **10** : 553-567.

Darcy F, Maes P, Gras-Masse H, Auriault C, Bossus M, Deslee D, Godard I, Cesbron MF, Tartar A, Capron A. Protection of mice and nude rats against toxoplasmosis by a multiple antigenic peptide construction derived from *Toxoplasma gondii* P30 antigen. *J Immunol.* 1992, **149** : 3636-3641.

Davis HL, Millan CL, Watkins SC. Immune-mediated destruction of transfected muscle fibers after direct gene transfer with antigen-expressing plasmid DNA. *Gene Ther.* 1997, **4** : 181-188.

Davis HL, McCluskie MJ. DNA vaccines for viral diseases. *Microbes Infect.* 1999, **1** : 7-21.

Debard N, Buzoni-Gatel D, Bout D. Intranasal immunization with SAG1 protein of *Toxoplasma gondii* in association with cholera toxin dramatically reduces development of cerebral cysts after oral infection. *Infect Immun.* 1996, **64** : 2158-2166.

Deckert-Schluter M, Rang A, Weiner D *et al.* Interferon-gamma receptor-deficiency renders mice highly susceptible to toxoplasmosis by decreased macrophage activation. *Lab Invest.* 1996, **75** : 827-841.

Denkers EY, Gazzinelli RT, Hien S, Caspar P, Sher A. Bone Marrow macrophages process exogenous *Toxoplasma gondii* polypeptides for recognition by parasite-specific cytolytic T lymphocytes. *J Immunol*. 1993, **150** : 517-526.

Denkers EY, Gazzinelli RT, Martin D, Sher A. Emergence of NK1.1+ cells as effectors of IFN-gamma dependent immunity to *Toxoplasma gondii* in MHC class I-deficient mice. *J Exp Med*. 1993, **178** :1465-1472.

Denkers EY. A *Toxoplasma gondii* superantigen : biological effects and implications for the host-parasite interaction. *Parasitology Today*. 1996, **12** : 362-365.

Denkers EY, Caspar P, Hien S, Sher A. *Toxoplasma gondii* infection induces specific nonresponsiveness in lymphocytes bearing the V beta 5 chain of the mouse T cell receptor. *J Immunol*. 1996, **156** : 1089-1094.

Denkers EY, Scharton-Kersten T, Barbieri S, Caspar P, Sher A. A role for CD4+ NK1.1+ T lymphocytes as major histocompatibility complex class II independent helper cells in the generation of CD8+ effector function against intracellular infection. *J Exp Med*. 1996, **184** : 131-139.

Denkers EY, Sher A. Role of natural killer and NK1+ T-cells in regulating cell-mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection. *Biochem Soc Trans*. 1997, **25** : 699-703.

Denkers EY, Yap G, Scharton-Kersten T *et al*. Perforin-mediated cytolysis plays a limited role in host resistance to *Toxoplasma gondii*. *J Immunol*. 1997, **159** : 1903-8.

Denkers EY, Gazzinelli RT. Regulation and function of T-cell-mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection. *Clin Microbiol Rev*. 1998, **11** : 569-88.

Denkers EY. T lymphocyte-dependent effector mechanisms of immunity to *Toxoplasma gondii*. *Microbes Infect*. 1999, **1** : 699-708.

Derouin F, Chau F, Caroff B, Romand S, Pocidalo JJ. Bases expérimentales du traitement de la toxoplasmose. *Med Mal Infect*. 1993, **23S** : 162-169.

Desmonts G, Couvreur J, Thulliez P, Saint-Joigny G, Colin J. Sérodiagnostic de la toxoplasmose acquise : des méthodes simples pour des questions précises. *Concours Med*. 1985, **107** : 227-234.

Desolme B, Mevelec M, 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** : 2512-2521.

Dimier IH, Bout DT. Rat intestinal epithelial cell line IEC-6 is activated by recombinant interferon-gamma to inhibit replication of the coccidian *Toxoplasma gondii*. *Eur J Immunol*. 1993, **23** : 981.

Dimier IH and Bout DT. Interferon-gamma-activated primary enterocytes inhibit *Toxoplasma gondii* replication : a role for intracellular iron. *Immunology*. 1998, **94** : 488-495.

- Dubey JP, Baker DG, Davis SW, Urban JF Jr, Shen SK. Persistence of immunity to toxoplasmosis in pigs vaccinated with a nonpersistent strain of *Toxoplasma gondii*. *Am J Vet Res*. 1994, **55** : 982-987.
- Dubey JP, Andrews CD, Thulliez P, Lind P, Kwok OC. Long-term humoral antibody responses by various serologic tests in pigs orally inoculated with oocysts of four strains of *Toxoplasma gondii*. *Vet Parasitol*. 1997, **68** : 41-50.
- Duquesne V, Auriault C, Darcy F, Decavel JP, Capron A. Protection of nude rats against *Toxoplasma* infection by excreted-secreted antigen-specific helper T cells. *Infect Immun*. 1990, **58** : 2120-2126.
- Esteban-Redondo I, Innes EA. *Toxoplasma gondii* infection in sheep and cattle. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 1997, **20** : 191-196.
- Fermin Z, Bout D, Ricciardi-Castagnoli P, Hoebeke J. Salbutamol as an adjuvant for nasal vaccination. *Vaccine*. 1999, **17** : 1936-1941.
- Finkelman FD, Katona IM, Mosmann TR, Coffman RL. IFN- γ regulates the isotypes of Ig secreted during *in vivo* humoral immune responses. *J Immunol*. 1988, **140** : 1022-1027.
- Fischer HG, Reichmann G, Hadding U. *Toxoplasma* proteins recognized by protective T lymphocytes. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1996, **219** : 175-182.
- Frenkel JK. Adoptive immunity to intracellular infection. *J Immunol*. 1967, **98** : 1309-1319.
- Frenkel JK. Immunity in toxoplasmosis. *Bull Pan Am Health Organ*. 1985, **19** : 354-367.
- Freund YR, Sgarlato G, Jacob CO, Suzuki Y, Remington JS. Polymorphisms in the tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) gene correlate with murine resistance to development of toxoplasmic encephalitis and with levels of TNF-alpha mRNA in infected brain tissue. *J Exp Med*. 1992, **175** : 683-688.
- Freyre A, Choromanski L, Fishback JL, Popiel I. Immunization of cats with tissue cysts, bradyzoites, and tachyzoites of the T-263 strain of *Toxoplasma gondii*. *J Parasitol*. 1993, **79** : 716-719.
- Gazzinelli RT, Hakim FT, Hieny S, Shearer GM, 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** : 286-292.
- Gazzinelli RT, Oswald IP, James SL, Sher A. IL-10 inhibits parasite killing and nitrogen oxide production by IFN-gamma-activated macrophages. *J Immunol*. 1992, **148** : 1792-1796.
- Gazzinelli RT, Hieny S, Wynn T, Wolf S, Sher A. IL-12 is required for the T-cell independent induction of IFN-gamma by an intracellular parasite and induces resistance in T-cell-deficient hosts. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993, **90** : 6115.

Gazzinelli RT, Wysocka M, Hayashi S *et al.* Parasite-induced IL-12 stimulates early IFN-gamma synthesis and resistance during acute infection with *Toxoplasma gondii*. *J Immunol.* 1994, **153** : 2533-2543.

Gazzinelli RT, Amichay D, Sharton-Kersten T, Grunwald E, Farber JM, Sher A. Role of macrophage-derived cytokines in the induction and regulation of cell-mediated immunity to *Toxoplasma gondii*. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1996, **219** : 127-39.

Gazzinelli RT, Wysocka M, Hieny S. 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-gamma et TNF-alpha. *J immunol.* 1996, **157** : 798-805.

Godard I, Estaquier J, Zenner L *et al.* Antigenicity and immunogenicity of P30-derived peptides in experimental models of toxoplasmosis. *Mol Immunol.* 1994, **31** : 1353-1363.

Graziosi C, Pantaleo G, Gant KR *et al.* Lack of evidence for the dichotomy of TH1 and TH2 predominance in HIV-infected individuals. *Science.* 1994, **265** : 244-248.

Guillet JG, Hoebeke J, Lengagne D *et al.* Haplotype specific homology scanning algorithm to predict T-Cell epitopes from protein sequences. *J Mol Recognition.* 1991, **4** : 17.

Hakim FT, Gazzinelli RT, Denkers E, Hieny S, Shearer GM, Sher A. CD8+ T cells from mice vaccinated against *Toxoplasma gondii* are cytotoxic for parasite-infected or antigen-pulsed host cells. *J Immunol.* 1991, **147** : 2310-2316.

Haque S, Khan I, Haque A, Kasper L. Impairment of the cellular immune response in acute murine toxoplasmosis: regulation of interleukin-2 production and macrophage-mediated inhibitory effects. *Infect Immun.* 1994, **62** : 2908-2916.

Haque S, Haque A, Kasper LH. A *Toxoplasma gondii*-derived factor(s) stimulates immune downregulation : an *in vitro* model. *Infect Immun.* 1995, **63** : 3442-3447.

Haque S, Dumon H, Haque A, Kasper LH. Alteration of intracellular calcium flux and impairment of nuclear factor-AT translocation in T cells during acute *Toxoplasma gondii* infection in mice. *J Immunol.* 1998, **161** : 6812-6818.

Hauser WE Jr, Tsai V. Acute toxoplasma infection of mice induces spleen NK cells that are cytotoxic for *T. gondii* *in vitro*. *J Immunol.* 1986, **136** : 313-319.

Hayashi S, Chan CC, Gazzinelli R, Roberge FG. Contribution of nitric oxide to the host parasite equilibrium in toxoplasmosis. *J Immunol.* 1996, **156** : 1476-1481.

Hermann A, Kappler JW, Marrack P, Pullen AN. Superantigens : mechanisms of T-cell stimulation and role in immune responses. *Annu Rev Immunol.* 1991, **9** : 745.

Hirschel B, Kaiser L. Prophylaxie des infections opportunistes : tableau récapitulatif. In *Le SIDA : guide du praticien ; diagnostic, traitement, prise en charge*. Ed. Med Hygiène SA, Genève, 1998 : 99.

Hunter CA, Subauste CS, Van Cleave VH, Remington JS. Production of gamma interferon by natural killer cells from *Toxoplasma gondii*-infected SCID mice: regulation by interleukin-10, interleukin-12, and tumor necrosis factor alpha. *Infect Immun*. 1994, **62** : 2818-2824.

Hunter CA, Candolfi E, Subauste C, Van Cleave V, Remington JS. Studies on the role of interleukin-12 in acute murine toxoplasmosis. *Immunology*. 1995, **84** : 16-20.

Innes EA, Wastling JM. Analysis of *in vivo* immune responses during *Toxoplasma gondii* infection using the technique of lymphatic cannulation. *Parasitology Today*. 1995, **11** : 268-271.

Johnson AM, McDonald PJ, Neoh SH. Monoclonal antibodies to *Toxoplasma* cell membrane surface antigens protect mice from toxoplasmosis. *J Protozool*. 1983, **30** : 351.

Johnson LL, Sayles PC. Interleukin-12, dendritic cells, and the initiation of host-protective mechanisms against *Toxoplasma gondii*. *J Exp Med*. 1997, **186** : 1799-802.

Kalinna BH. DNA vaccines for parasitic infections. *Immunol Cell Biol*. 1997, **75** : 370-375.

Kasper LH, Crabb JH, Pfefferkorn ER. Purification of a major membrane protein of *Toxoplasma gondii* by immunoabsorption with a monoclonal antibody. *J Immunol*. 1983, **130** : 2407-2012.

Kasper LH, Currie KM, Bradley MS. An unexpected response to vaccination with a purified major membrane tachyzoite antigen (P30) of *Toxoplasma gondii*. *J Immunol*. 1985, **134** : 3426.

Kasper LH, Khan IA, Ely KH, Buelow R, Boothroyd JC. Antigen-specific (p30) mouse CD8+ T cells are cytotoxic against *Toxoplasma gondii*-infected peritoneal macrophages. *J Immunol*. 1992, **148** : 1493-1498.

Kasper LH, Khan IA. Role of P30 in host immunity and pathogenesis of *T. gondii* infection. *Res Immunol*. 1993, **144** : 45-48.

Katlama C. Impact de la prévention de la toxoplasmose cérébrale. *J Neuroradiol*. 1995, **22** : 193-195.

Khan IA, Ely KH, Kasper LH. A purified parasite antigen (p30) mediates CD8+ T cell immunity against fatal *Toxoplasma gondii* infection in mice. *J Immunol*. 1991, **147** : 3501-3506.

Khan IA, Matsuura T, Kasper LH. Interleukin-12 enhances murine survival against acute toxoplasmosis. *Infect Immun*. 1994, **62** : 1639-1642.

Khan IA, Ely KH, Kasper LH. Antigen-specific CD8+ T cell clone protects against acute *Toxoplasma gondii* infection in mice. *J Immunol*. 1994, **152** : 1856-1860.

Khan IA, Matsuura T, Kasper LH. IL-10 mediates immunosuppression following primary infection with *Toxoplasma gondii* in mice. *Parasite Immunol*. 1995, **17** : 185-195.

- Khan IA, Matsuura T, Fonseka S, Kasper LH. Production of nitric oxide (NO) is not essential for protection against acute *Toxoplasma gondii* infection in IRF-1^{-/-} mice. *J Immunol.* 1996, **156** : 636-643.
- Khan IA, Matsuura T, Kasper LH. Activation-mediated CD4⁺ T cell unresponsiveness during acute *Toxoplasma gondii* infection in mice. *Int Immunol.* 1996, **8** : 887-96.
- Khan IA, Matsuura T, Kasper LH. Inducible nitric oxide synthase is not required for long-term vaccine-based immunity against *Toxoplasma gondii*. *J Immunol.* 1998, **161** : 2994-3000.
- Khan IA, Green WR, Kasper LH, Green KA, Schwartzman JD. Immune CD8(+) T cells prevent reactivation of *Toxoplasma gondii* infection in the immunocompromised host. *Infect Immun.* 1999, **67** : 5869-5876.
- Kohler S, Delwiche CF, Denny PW *et al.* A plastid of probable green algal origin in apicomplexan parasites. *Science.* 1997, **275** : 1485-1489.
- Krahenbuhl JL, Ruskin J, Remington JS. The use of killed vaccines in immunization against an intracellular parasite : *Toxoplasma gondii*. *J Immunol.* 1972, **108** : 425-431.
- Langermans J, Van Der Hulst M, Nibbering P, Hiemstra P, Fransen L, Van Furth R. IFN- γ -induced L-arginine-dependent toxoplasmastatic activity in murine peritoneal macrophages is mediated by endogenous tumor necrosis factor- α . *J immunol.* 1992, **148** : 568-574.
- Lappin MR, Marks A, Greene CE *et al.* 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** : 95-100.
- Letscher-Bru V, Villard O, Risse B, Zauke M, Klein JP, Kien TT. Protective effect of vaccination with a combination of recombinant surface antigen 1 and interleukin-12 against toxoplasmosis in mice. *Infect Immun.* 1998, **66** : 4503-4506.
- Levy JK, Ritchey JW, Rottman JB *et al.* Elevated interleukin-10-to-interleukin-12 ratio in feline immunodeficiency virus-infected cats predicts loss of type 1 immunity to *Toxoplasma gondii*. *J Infect Dis.* 1998, **178** : 503-511.
- Lindberg RE, Frenkel JK. Toxoplasmosis in nude mice. *J Parasitol.* 1977, **63** : 219-221.
- Lunden A, Lovgren K, Uggla A, Araujo FG. Immune responses and resistance to *Toxoplasma gondii* in mice immunized with antigens of the parasite incorporated into immunostimulating complexes. *Infect Immun.* 1993, **61** : 2639-2643.
- Lunden A. Immune responses in sheep after immunization with *Toxoplasma gondii* antigens incorporated into iscoms. *Vet Parasitol.* 1995, **56** : 23-35.
- Lunden A, Parmley SF, Bengtsson KL, Araujo FG. Use of a recombinant antigen, SAG2, expressed as a glutathione-S-transferase fusion protein to immunize mice against *Toxoplasma gondii*. *Parasitol Res.* 1997, **83** : 6-9.

Ma X, Chow JM, Gri G *et al.* The interleukin 12 p40 gene promoter is primed by interferon-gamma in monocytic cells. *J Exp Med.* 1996, **183** : 147.

MacDonald HR, Lees RK, Baschieri S, Herrmann T, Lussow AR. Peripheral T-cell reactivity to bacterial superantigens *in vivo* : the response/anergy paradox. *Immunol Rev.* 1993, **133** : 105.

MacGregor RR *et al.* First human trial of a DNA-based vaccine for treatment of human immunodeficiency virus type 1 infection : safety and host response. *J Infect Dis.* 1998, **178** : 92-100.

Mack DG and McLeod R. Human *Toxoplasma gondii*-specific secretory immunoglobulin-A reduces *T. gondii* infection of enterocytes *in vitro*. *J Clin Invest.* 1992, **90** : 2585-2592.

Maggi E, Mazzetti M, Ravina A *et al.* Ability of HIV to promote a TH1 to TH0 shift and to replicate preferentially in TH2 and TH0 cells. *Science.* 1994, **265** : 244-248.

Mateus-Pinilla NE, Dubey JP, Choromanski L, Weigel RM. A field trial of the effectiveness of a feline *Toxoplasma gondii* vaccine in reducing *T. gondii* exposure for swine. *J Parasitol.* 1999, **85** : 855-860.

McLeod R, Estes RG, Mack DG, Cohen H. Immune response of mice to ingested *Toxoplasma gondii*: a model of *Toxoplasma* infection acquired by ingestion. *J Infect Dis.* 1984, **149** : 234-244.

McLeod R, Frenkel JK, Estes RG, Mack DG, Eisenhauer PB, Gibori G. Subcutaneous and intestinal vaccination with tachyzoites of *Toxoplasma gondii* and acquisition of immunity to peroral and congenital toxoplasma challenge. *J Immunol.* 1988, **140** : 1632-1637.

Mevelec MN, Chardes T, Mercereau-Puijalon O *et al.* Molecular cloning of GRA4, a *Toxoplasma gondii* dense granule protein, recognized by mucosal IgA antibodies. *Mol Biochem Parasitol.* 1992, **56** : 227-238.

Mevelec MN, Mercereau-Puijalon O, Buzoni-Gatel D *et al.* Mapping of B epitopes in GRA4, a dense granule antigen of *Toxoplasma gondii* and protection studies using recombinant proteins administered by the oral route. *Parasite immunol.* 1998, **20** : 183-195.

Meyaard L, Hovenjamp E, Otto S, Miedema F. IL-12-induced IL-10 production by human T cells as a negative feedback for IL-12-induced immune responses. *J immunol.* 1996, **156** : 2776-2782.

Miedema F, Petit AJ, Terpstra FG *et al.* Immunological abnormalities in human immunodeficiency virus (HIV)-infected asymptomatic homosexual men. HIV affects the immune system before CD4+ T helper cell depletion occurs. *J Clin Invest.* 1988, **82** : 1908-1914.

Mineo JR, McLeod R, Mack D, Smith J, Khan IA, Ely KH, Kasper LH. Antibodies to *Toxoplasma gondii* major surface protein (SAG-1, P30) inhibit infection of host cells and are produced in murine intestine after peroral infection. *J Immunol.* 1993, **150** : 3951-3964.

- Morein B, Ekstrom L, Lovgren K. Increased immunogenicity of a non-amphipathic protein (BSA) after inclusion into iscoms. *J Immunol Methods*. 1990, **128** : 177-181.
- Morein B, Lovgren K, Ronnberg B, Sjolander A, Villacres-Eriksson M. Immunostimulating complexes, clinical potential in vaccine development. *Clin Immunother*. 1995, **3** : 461-475.
- Murray HW, Juangbhanich CW, Nathan CF, Cohn ZA. Macrophage oxygen-dependent antimicrobial activity. The role of oxygen intermediates. *J Exp Med*. 1979, **150** : 950.
- Murray HW, Spitalny GL, Nathan CF. Activation of mouse peritoneal macrophages *in vitro* and *in vivo* by interferon-gamma. *J Immunol*. 1985, **134** : 1619.
- Murray PJ, Wang L, Onufryk C, Tepper RI, Young RA. T cell-derived IL-10 antagonizes macrophage function in mycobacterial infection. *J Immunol*. 1997, **158** : 315-321.
- Nakao M, Konishi E. Neutrophil chemotactic factors secreted from *Toxoplasma gondii*. *Parasitology*. 1991, **103** : 29.
- Nam HW, Choi WY. Inhibition of Con A-induced lymphocyte proliferation by peritoneal exudate of *Toxoplasma gondii*-infected mice. *Korean J Parasitol*. 1995, **33** : 195-200.
- Neyer LE, Grunig G, Fort M, Remington JS, Rennick D, Hunter CA. Role of interleukin-10 in regulation of T-cell-dependent and T-cell-independent mechanisms of resistance to *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun*. 1997, **65** : 1675-82.
- Nichols WW, Ledwith BJ, Manam SV, Troilo PJ. Potential DNA vaccine integration into host cell genome. *Ann NY Acad Sci*. 1995, **772** : 30-39.
- Nielsen HV, Lauemoller SL, 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** : 6358-6363.
- Nozais JP, Datry A, Danis M. La toxoplasmose. In *Traité de parasitologie médicale*. Ed. Pradel, Paris, 1996 : 147-169.
- Okada E *et al*. Intranasal immunization of a DNA vaccine with IL-12- and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)-expressing plasmids in liposomes induces strong mucosal and cell-mediated immune responses against HIV-1 antigens. *J Immunol*. 1997, **159** : 3638-3647.
- Overnes G, Nesse LL, Waldeland H, Lovgren K, Gudding R. Immune response after immunization with an experimental *Toxoplasma gondii* ISCOM vaccine. *Vaccine*. 1991, **9** : 25-28.
- Panina-Bordignon P, Mazzeo D, Lucia PD *et al*. β_2 -agonists prevent Th1 development by selective inhibition of interleukin-12. *J Clin Invest*. 1997, **100** : 1513-1519.
- Parker SJ, Roberts CW, Alexander J. CD8⁺ T cells are the major lymphocyte subpopulation involved in the protective immune response to *Toxoplasma gondii* in mice. *Clin Exp Immunol*. 1991, **84** : 207-212.

Parmley SF, Sgarlato GD, Mark J, Prince JB, Remington JS. Expression, characterization, and serologic reactivity of recombinant surface antigen P22 of *Toxoplasma gondii*. *J Clin Microbiol*. 1992, **30** : 1127-1133.

Perussia B. Lymphokine-activated killer cells, natural killer cells and cytokines. *Curr Opin Immunol*. 1991, **3** : 49.

Petersen E, Nielsen HV, Christiansen L, Spenter J. Immunization with *E. coli* produced recombinant *T. gondii* SAG1 with alum as adjuvant protect mice against lethal infection with *Toxoplasma gondii*. *Vaccine*. 1998, **16** : 1283-1289.

Pfefferkorn ER, Pfefferkorn LC. *Toxoplasma gondii* : isolation and preliminary characterization of temperature-sensitive mutants. *Exp Parasitol*. 1976, **39** : 365-376.

Pfefferkorn ER. 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** : 908-912.

Pfefferkorn ER, Guyre RM. Inhibition of growth of *Toxoplasma gondii* in cultured fibroblasts by human recombinant gamma interferon. *Infect Immun*. 1984, **44** : 211.

Pinckney RD, Lindsay DS, Blagburn BL, Boosinger TR, McLaughlin SA, Dubey JP. Evaluation of the safety and efficacy of vaccination of nursing pigs with living tachyzoites of two strains of *Toxoplasma gondii*. *J Parasitol*. 1994, **80** : 438-448.

Popiel I, Gold M, Choromanski L. Tissue cyst formation of *Toxoplasma gondii* T-263 in cell culture. *J Eukaryot Microbiol*. 1994, **41** : 17S.

Potasman I, Araujo FG, Remington JS. *Toxoplasma* antigens recognized by naturally occurring human antibodies. *J Clin Microbiol*. 1986, **24** : 1050-1054.

Presky DH, Gubler U, Chizzonite RA, Gately MK. IL-12 receptors and receptor antagonists. *Res Immunol*. 1996, **146** : 439.

Prigione I, Facchetti P, Ghiotto F, Tasso P, Pistoia V. *Toxoplasma gondii*-specific CD4+ T cell clones from healthy, latently infected humans display a Th0 profile of cytokine secretion. *Eur J Immunol*. 1995, **25** : 1298-1305.

Purner MB, Berens RL, Nash PB *et al*. CD4-mediated and CD8-mediated cytotoxic and proliferative immune responses to *Toxoplasma gondii* in seropositive humans. *Infect Immun*. 1996, **64** : 4330-4338.

Rammensee HG, Friede T, Stevanovic S. MHC ligands and peptide motifs : first listing. *Immunogenetics*. 1995, **41** : 178.

Reccurt-Carrere MP, Bessieres MH, Seguela JP. Evaluation d'un test ELISA de détermination des IgM et IgG sériques dans la toxoplasmose humaine. *Med Mal Infect*. 1987, **10** : 561-567.

Rev Presc. HIV baisse de la prévalence de la toxoplasmose cérébrale. 1999, **19** : 457.

Rhodes GH, Dwarki VV, Abai AM *et al.* Injection of expression vector containing viral genes induces cellular, humoral, and protective immunity. *Vaccines*. 1993, **93** : 137-40.

Roman M. Immunostimulatory DNA sequences function as T helper-1-promoting adjuvants. *Nature Medecine*. 3 : 849-854.

Saavedra R, Becerril MA, Dubeaux C *et al.* Epitopes recognized by human T lymphocytes in the ROP2 protein antigen of *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun*. 1996, **64** : 3858-3862.

Sackoff J, Mc Farland J, Su S, Bryan E. Prophylaxis for opportunistic infections among HIV-infected patients receiving medical care. *J Acquir Immune Defic Syndr Retroviral*. 1998, **19** : 387-392.

Sayles PC, Johnson LL. Intact immune defenses are required for mice to resist the ts-4 vaccine strain of *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun*. 1996, **64** : 3088-3092.

Sayles PC, Johnson LL. Exacerbation of toxoplasmosis in neutrophil-depleted mice. *Nat Immun*. 1996-97, **15** : 249-58.

Scharton-Kersten T, Denkers EY, Gazzinelli R, Sher A. Role of IL12 in induction of cell-mediated immunity to *Toxoplasma gondii*. *Res Immunol*. 1995, **146** : 539-545.

Scharton-Kersten T, Wynn TA, Denkers EY *et al.* In the absence of endogenous IFN-gamma, mice develop unimpaired IL-12 responses to *Toxoplasma gondii* while failing to control acute infection. *J Immunol*. 1996, **157** : 4045-4054

Scharton-Kersten T, Contursi C, Masumi A, Sher A, Ozato K. Interferon consensus sequence binding protein-deficient mice display impaired resistance to intracellular infection due to a primary defect in interleukin 12 p40 induction. *J Exp Med*. 1997, **186** : 1523-34.

Scharton-Kersten TM, Yap G, Magram J, Sher A. Inducible nitric oxide is essential for host control of persistent but not acute infection with the intracellular pathogen *Toxoplasma gondii*. *J Exp Med*. 1997, **185** : 1261-1273.

Schluter D, Deckert-Schluter M, Lorenz E, Meyer T, Rollinghoff M, Bogdan C. Inhibition of inducible nitric oxide synthase exacerbates chronic cerebral toxoplasmosis in *Toxoplasma gondii*-susceptible C57BL/6 mice but does not reactivate the latent disease in *T. gondii*-resistant BALB/c mice. *J Immunol*. 1999, **162** : 3512-3518.

Sharma SD, Araujo FG, Remington JS. Toxoplasma antigen isolated by affinity chromatography with monoclonal antibody protects mice against lethal infection with *Toxoplasma gondii*. *J Immunol*. 1984, **133** : 2818-20.

Sher A, Oswald IP, Hieni S, Gazzinelli RT. *Toxoplasma gondii* induces a T-independent IFN- γ response in natural killer cells that requires both adherent accessory cells and TNF- α . *J Immunol*. 1993, **150** : 3982-3989.

Shirahata T, Yamashita T, Ohta C, Goto H, Nakane A. CD8⁺ T lymphocytes are the major cell population involved in the early gamma interferon response and resistance to acute primary *Toxoplasma gondii* infection in mice. *Microbiol Immunol*. 1994, **38** : 789-96.

Sibley LD, Adams LB, Krahenbuhl JL. Macrophage interactions in toxoplasmosis. *Res Immunol.* 1993, **144** : 38-40.

Simmonds RS, Shearer MH, Kennedy RC. DNA vaccines- From principle to practice. *Parasitology Today.* 1997, **13** : 328-331.

Sousa CR, Hieny S, Scharton-Kersten T *et al.* *In vivo* microbial stimulation induces rapid CD40 ligand-independent production of interleukin 12 by dendritic cells and their redistribution to T cell areas. *J Exp Med.* 1997, **186** : 1819-1829.

Spence JA, Mitchell GBB, McNally JM, Blewett DA, Wright F. The vaccinal efficacy of the S48 strain 'Toxovax' of *Toxoplasma gondii* against natural field outbreaks of ovine toxoplasmosis. Abstracts of the *VIth European Multicolloquium of Parasitology*, The Hague, p. 103.

Subauste CS, Koniaris AH, Remington JS. Murine CD8+ cytotoxic T lymphocytes lyse *Toxoplasma gondii*-infected cells. *J Immunol.* 1991, **147**: 3955-3959.

Subauste CS, Remington JS. Role of gamma interferon in *Toxoplasma gondii* infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1991, **10** : 58-67.

Supply P, Sutton P, Coughlan SN *et al.* Immunogenicity of recombinant BCG producing the GRA1 antigen from *Toxoplasma gondii*. *Vaccine.* 1999, **17** : 705-14.

Suzuki Y, Orellana MA, Schreiber RD, Remington JS. Interferon-gamma: the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. *Science.* 1988, **240** : 516-518.

Suzuki Y, Remington JS. Dual regulation of resistance against *Toxoplasma gondii* infection by Lyt-2+ and Lyt-1+, L3T4+ T cells in mice. *J Immunol.* 1988, **140** : 3943-3946.

Suzuki Y, Conley FK, Remington JS. Importance of endogenous IFN-gamma for prevention of toxoplasmic encephalitis in mice. *J Immunol.* 1989, **143** : 2045-2050.

Suzuki Y, Joh K, Orellana MA, Conley FK, Remington JS. A gene(s) within the H-2D region determines the development of toxoplasmic encephalitis in mice. *Immunology.* 1991, **74** : 732-739.

Suzuki Y, Joh K, Kwon OC, Yang Q, Conley FK, Remington JS. MHC class I gene(s) in the D/L region but not the TNF-alpha gene determines development of toxoplasmic encephalitis in mice. *J Immunol.* 1994, **153** : 4649-54.

Tam JP. Synthetic peptide vaccine design : synthesis and properties of a high-density multiple antigenic peptide system. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1988, **85** : 5409.

Tang D, De Vit M, Johnston SA. Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature.* 1992, **356** : 152-154.

Than S, Hu R, Oyaizu N *et al.* Cytokine pattern in relation to disease progression in human immunodeficiency virus-infected children. *J Infect Dis.* 1997, **175** : 47-56.

Thomas SM, Garrity LF, Brandt CR *et al.* IFN- γ -mediated antimicrobial response. Indolamine 2,3-dioxygenase-deficient mutant host cells no longer inhibit intracellular *Chlamydia spp.* Or *Toxoplasma* growth. *J Immunol.* 1993, **150** : 5529-5534.

Tobery TW, Siliciano RF. Targeting of HIV-1 antigens for rapid intracellular degradation enhances cytotoxic T lymphocyte recognition and the induction of de novo CTL responses *in vivo* after immunization. *J Exp Med.* 1997, **185** : 909-920.

Ulmer JB, Deck RR, Dewitt CM, Donnelly JJ, Liu MA. Génération of MHC class I-restricted cytotoxic T lymphocytes by expression of a viral protein in muscle cells : antigen presentation by non muscle cells. *Immunology.* 1996, **89** : 59-67.

Velge-Roussel F, Chardes T, Mevelec P, Brillard M, Hoebeke J, Bout D. Epitopic analysis of the *Toxoplasma gondii* major surface antigen SAG1. *Mol Biochem Parasitol.* 1994, **66** : 3138.

Velge-Roussel F, Moretto M, Buzoni-Gatel D *et al.* Differences in immunological response to a *T. gondii* protein (SAG1) derived peptide between two strains of mice : effect on protection in *T. gondii* infection. *Mol Immunol.* 1997, **34** : 1045-1056.

Vercammen M, Scorza T, Huygen K *et al.* DNA vaccination with genes encoding *Toxoplasma gondii* antigens GRA1, GRA7, and ROP2 induces partially protective immunity against lethal challenge in mice. *Infect Immun.* 2000, **68** : 38-45.

Waine GJ, McManus DP. Nucleic acids: vaccines of the future. *Parasitology Today.* 1995, **11** : 113-116.

Waldeland H, Pfefferkorn ER, Frenkel JK. Temperature-sensitive mutants of *Toxoplasma gondii* : pathogenicity and persistence in mice. *J Parasitol.* 1983, **69** : 171-175.

Wastling JM, Harkins D, Maley S *et al.* Kinetics of the local and systemic antibody response to primary and secondary infection with S48 *Toxoplasma gondii* in sheep. *J Comp Pathol.* 1995, **112** : 53-62.

Wilkins MF, O'Connell E, Te Punga WA. Toxoplasmosis in sheep. Effect of a killed vaccine on lamb losses caused by experimental challenge with *Toxoplasma gondii*. *New Zealand Veterinary Journal.* 1987, **35** : 31-34.

Woodman JP, Dimier IH, Bout DT. Human endothelial cells are activated by interferon-gamma to inhibit *Toxoplasma gondii* replication. *J Immunol.* 1991, **147** : 2019.

Wolff JA, Malone RW, Williams P *et al.* Direct gene transfer into mouse muscle *in vivo*. *Science.* 1990, **247** : 1465-1468.

Woodman JP, Dimier IH, Bout DT. Human endothelial cells are activated by IFN-gamma to inhibit *Toxoplasma gondii* replication. Inhibition is due to a different mechanism from that existing in mouse macrophages and human fibroblasts. *J Immunol.* 1991, **147** : 2019-2023.

Yamashita K, Yui K, Ueda M, Yano A. Cytotoxic T-lymphocyte-mediated lysis of *Toxoplasma gondii*-infected target cells does not lead to death of intracellular parasites. *Infect Immun.* 1998, **66** : 4651-4655.

Yap GS, Scharton-Kersten T, Ferguson DJ, Howe D, Suzuki Y, Sher A. Partially protective vaccination permits the development of latency in a normally virulent strain of *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun*. 1998, **66** : 4382-4388.

RESUME

Toxoplasma gondii, protozoaire intracellulaire obligatoire, est l'agent causal de la toxoplasmose. Infection bénigne chez l'individu immunocompétent, elle peut entraîner des complications importantes, susceptibles de menacer le pronostic vital lorsqu'elle survient chez le nouveau-né contaminé en cours de grossesse et chez les sujets immunodéprimés. En médecine vétérinaire, la toxoplasmose représente l'une des zoonoses les plus répandues. La parasitose est généralement asymptomatique mais chez quelques espèces, notamment le mouton, elle peut être la cause de pertes économiques considérables. Le développement d'un vaccin présente donc un intérêt primordial.

Les concepts nouveaux de l'immunologie ont permis de faire évoluer les approches vaccinales. De réels progrès ont été accomplis et un objectif pratique a été atteint en médecine vétérinaire : le vaccin « Toxovax » est commercialisé depuis plus de 10 ans dans les pays de grands élevages ovins. Vacciner la population humaine reste néanmoins une échéance plus lointaine. Nouveaux adjuvants (liposomes, ISCOMs, IL-12...) protéines recombinantes, peptides linéaires ou MAP, insertion de gènes dans un vecteur atténué, immunisation muqueuse ou génique à l'aide d'ADN nu plasmidique : tous les nouveaux modes de présentation ont été testés sur des modèles murins avec des résultats souvent décevants. L'essentiel du problème réside dans l'incapacité des candidats vaccins à développer une immunité complètement stérilisante. Cet objectif, jamais atteint dans une autre vaccination, est probablement utopique.