



## Open Archive TOULOUSE Archive Ouverte (OATAO)

OATAO is an open access repository that collects the work of Toulouse researchers and makes it freely available over the web where possible.

This is an author-deposited version published in : <http://oatao.univ-toulouse.fr/>  
Eprints ID : 3035

**To cite this document :**

Sutaine, Vanessa (2009) Etude de la réponse anti-corps contre *Toxoplasma gondii* dans le cadre d'une sélection divergente sur la résistance aux infections mammaires Thesis

Any correspondance concerning this service should be sent to the repository administrator: [staff-oatao@inp-toulouse.fr](mailto:staff-oatao@inp-toulouse.fr)

# Etude de la réponse anticorps contre *Toxoplasma gondii* dans le cadre d'une sélection divergente sur la résistance aux infections mammaires

---

THESE  
pour obtenir le grade de  
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

*présentée et soutenue publiquement en 2009  
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

*par*

**Vanessa, Lydie SUTAINÉ**  
Née le 10 Février 1984 à Grande-Synthe (59)

---

**Directeur de thèse : Docteur Gilles FOUCRAS**

---

## JURY

PRESIDENT :  
**M. Alexis VALENTIN**

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEUR :  
**M. Gilles FOUCRAS**  
**M. Philippe JACQUIET**

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE  
Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

---



# Etude de la réponse anticorps contre *Toxoplasma gondii* dans le cadre d'une sélection divergente sur la résistance aux infections mammaires

---

THESE  
pour obtenir le grade de  
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

DIPLOME D'ÉTAT

*présentée et soutenue publiquement en 2009  
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

*par*

**Vanessa, Lydie SUTAINÉ**  
Née le 10 Février 1984 à Grande-Synthe (59)

---

Directeur de thèse : Docteur Gilles FOUCRAS

---

## JURY

PRESIDENT :  
**M. Alexis VALENTIN**

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEUR :  
**M. Gilles FOUCRAS**  
**M. Philippe JACQUIET**

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE  
Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE



**Ministère de l'Agriculture et de la Pêche  
ECOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE TOULOUSE**

**Directeur** : M. A. MILON

**Directeurs honoraires** : M. G. VAN HAVERBEKE.  
M. P. DESNOYERS

**Professeurs honoraires** :

M. L. FALIU	M. J. CHANTAL	M. BODIN ROZAT DE MENDRES NEGRE
M. C. LABIE	M. JF. GUELFY	
M. C. PAVAU	M. EECKHOUTTE	
M. F. LESCURE	M. D. GRIESS	
M. A. RICO	M. CABANIE	
M. A. CAZIEUX	M. DARRE	
Mme V. BURGAT	M. HENROTEAUX	

**PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE**

M. **BRAUN Jean-Pierre**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*  
M. **DORCHIES Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*  
M. **EUZEBY Jean**, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*  
M. **TOUTAIN Pierre-Louis**, *Physiologie et Thérapeutique*

**PROFESSEURS 1<sup>o</sup> CLASSE**

M. **AUTEFAGE André**, *Pathologie chirurgicale*  
Mme **CLAUW Martine**, *Pharmacie-Toxicologie*  
M. **CORPET Denis**, *Science de l'Aliment et Technologies dans les Industries agro-alimentaires*  
M. **DELVERDIER Maxence**, *Anatomie Pathologique*  
M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*  
M. **FRANC Michel**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*  
M. **MARTINEAU Guy**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*  
M. **PETIT Claude**, *Pharmacie et Toxicologie*  
M. **REGNIER Alain**, *Physiopathologie oculaire*  
M. **SAUTET Jean**, *Anatomie*  
M. **SCHELCHER François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*

**PROFESSEURS 2<sup>o</sup> CLASSE**

Mme **BENARD Geneviève**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*  
M. **BERTHELOT Xavier**, *Pathologie de la Reproduction*  
M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Physiologie et Thérapeutique*  
M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, Statistiques, Modélisation*  
M. **DUCOS Alain**, *Zootchnie*  
M. **DUCOS DE LAHITTE Jacques**, *Parasitologie et Maladies parasitaires*  
Mme **GAYRARD-TROY Véronique**, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*  
M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*  
Mme **HAGEN-PICARD Nicole**, *Pathologie de la Reproduction*  
M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et Thérapeutique*  
M. **LIGNEREUX Yves**, *Anatomie*  
M. **PICAVET Dominique**, *Pathologie infectieuse*  
M. **SANS Pierre**, *Productions animales*  
Mme **TRUMEL Catherine**, *Pathologie médicale des Equidés et Carnivores*

**INGENIEUR DE RECHERCHE**

M. TAMZALI Youssef, *Responsable Clinique Equine*

**PROFESSEURS CERTIFIES DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE**

Mme MICHAUD Françoise, *Professeur d'Anglais*

M. SEVERAC Benoît, *Professeur d'Anglais*

**MAITRES DE CONFERENCES HORS CLASSE**

M. JOUGLAR Jean-Yves, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*

**MAITRES DE CONFERENCES (classe normale)**

M. ASIMUS Erik, *Pathologie chirurgicale*

M. BAILLY Jean-Denis, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*

Mme BENNIS-BRET Lydie, *Physique et Chimie biologiques et médicales*

M. BERGONIER Dominique, *Pathologie de la Reproduction*

M. BERTAGNOLI Stéphane, *Pathologie infectieuse*

Mme BOUCLAINVILLE-CAMUS Christelle, *Biologie cellulaire et moléculaire*

Mlle BOULLIER Séverine, *Immunologie générale et médicale*

Mme BOURGES-ABELLA Nathalie, *Histologie, Anatomie pathologique*

M. BRUGERE Hubert, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*

Mlle CADIERGUES Marie-Christine, *Dermatologie*

M. CORBIERE Fabien, *Pathologie des Ruminants*

Mlle DIQUELOU Armelle, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*

M. DOSSIN Olivier, (DISPONIBILITE) *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*

M. FOUCRAS Gilles, *Pathologie du Bétail*

M. GUERIN Jean-Luc, *Elevage et Santé avicoles et cunicoles*

M. JACQUIET Philippe, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*

M. JAEG Jean-Philippe, *Pharmacie et Toxicologie*

Mlle LACROUX Caroline, *Anatomie Pathologique des animaux de rente*

M. LYAZRHI Faouzi, *Statistiques biologiques et Mathématiques*

M. MATHON Didier, *Pathologie chirurgicale*

M. MEYER Gilles, *Pathologie des ruminants*

Mme MEYNAUD-COLLARD Patricia, *Pathologie chirurgicale*

M. MOGICATO Giovanni, *Anatomie, Imagerie médicale*

M. MONNEREAU Laurent, *Anatomie, Embryologie*

Mlle PALIERNE Sophie, *Chirurgie des animaux de compagnie*

Mme PRIYMENKO Nathalie, *Alimentation*

Mme LETRON-RAYMOND Isabelle, *Anatomie pathologique*

Mme TROEGLER-MEYNADIER Annabelle, *Alimentation*

M. VOLMER Romain, *Microbiologie et Infectiologie*

M. VERWAERDE Patrick, *Anesthésie, Réanimation*

**MAITRES DE CONFERENCES CONTRACTUELS**

Mlle BUCK-ROUCH, *Médecine interne des animaux de compagnie*

M. CASSARD Hervé, *Pathologie du bétail*

M. DOUET Jean-Yves, *Ophthalmologie*

M. SEGUELA Jérôme, *Médecine interne des animaux de compagnie*

M. VERSET Michaël, *Chirurgie des animaux de compagnie*

**ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS**

Mlle BIBBAL Delphine, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*

M. CONCHOU Fabrice, *Imagerie médicale*

M. GIN Thomas, *Production et pathologie porcine*

M. LIENARD Emmanuel, *Parasitologie et maladies parasitaires*

M. NOUVEL Laurent, *Pathologie de la reproduction*

M. RABOISSON Didier, *Productions animales*

Mlle TREVENNEC Karen, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles et porcins*

## **REMERCIEMENTS**

### **A Monsieur le Professeur Alexis VALENTIN**

Professeur des Universités

Praticien hospitalier

*Zoologie – Parasitologie*

Qui nous a fait l'honneur d'accepter la Présidence de notre Jury de thèse,  
Hommages respectueux.

### **A Monsieur le Docteur Gilles FOUCRAS**

Maître de Conférences de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

*Pathologie du Bétail*

Qui nous a guidés tout au long de ce travail,  
Pour ses conseils avisés et sa disponibilité,  
Qu'il veuille bien trouver ici, l'expression de notre sincère reconnaissance.

### **A Monsieur le Docteur Philippe JACQUIET**

Maître de Conférences de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

*Parasitologie et Maladies Parasitaires*

Qui nous a fait l'honneur de participer à notre Jury de thèse,  
Sincères remerciements.

---





Tout d'abord, un grand merci à Françoise et Christelle pour leur travail et leur aide.

Et, comme cette thèse est le symbole de l'aboutissement de mes études, elle est aussi l'occasion pour moi de remercier celles et ceux qui m'ont soutenue et encouragée sur ce parcours.

**A ma Maman,**

Qui a toujours su que je serai un jour vétérinaire. Pour sa volonté, son goût de la réflexion et de la discussion. Pour son dévouement. Ce travail lui est dédié.

**A mon Papa,**

Qui a remarquablement pris le relai. Pour son soutien. Puisse cette thèse lui apporter le couronnement des sacrifices consentis, mais aussi le témoignage de mon immense gratitude et de tout mon amour.

**A Annabelle et Adeline, mes chères sœurs,**

De Prague à Londres, en passant par le Parc national d'Ordesa, Puy St Vincent ou St Aygulf, pour que nos chemins nous mènent encore loin pourvu qu'on soit toujours aussi proches! Et mes compères sangliers, à quand la prochaine dégustation de galettes dans une caravane au pied d'un baobab ?!

**A Carole,**

Sans qui ces 5 ans d'école auraient été bien plats et qui m'a soutenue depuis les 1<sup>ers</sup> pas : depuis la classe prépa en passant par nos recherches de chats, comme dans tous les moments les plus forts..... Four to the Floor !!!!

**A Marco,**

Un cuisinier hors pair dont la présence et la patience m'ont été très précieuses durant cette année charnière. Lima Yankee.

Aux 4 coins de France, nos régions ont du talent et font vivre les amitiés :

**A Eline**, exilée à Colmar, plein de pensées chaleureuses pour résister au froid de canard !

**A Sarah**, dans l'Hérault, bonne chance à la future thésarde passionnée de végétaux !

**A Juliette**, à Pont de Salars, entre compagne de pique et tournée des bars !

Plus sérieusement, à tous ceux qui ont su me transmettre leur passion et leur savoir faire.

---



# TABLE DES MATIERES

<b><u>TABLE DES ILLUSTRATIONS</u></b>	<b><u>13</u></b>
<b><u>INTRODUCTION</u></b>	<b><u>15</u></b>
<b><u>A. PREMIERE PARTIE : CONTEXTE DE L'ETUDE</u></b>	<b><u>17</u></b>
<b>I. Sélection génétique pour une résistance accrue aux infections mammaires</b>	<b>17</b>
I.1. Importance des infections mammaires et de leur maîtrise en élevage ovin laitier	17
I.1.1. Les infections mammaires, un problème majeur en élevage laitier	17
I.1.2. Les moyens de lutte contre les infections mammaires	17
I.2. Sélection génétique sur le critère CCS	18
I.2.1. Sélection génétique pour une meilleure résistance aux maladies	18
I.2.2. Sélection génétique pour la résistance aux mammites	19
I.3. Problème de la détérioration d'autres critères à la suite d'une sélection génétique	22
<b>II. La toxoplasmose chez les ovins et la réponse immunitaire de l'hôte</b>	<b>23</b>
II.1. Epidémiologie et importance de la toxoplasmose	23
II.1.1. Cycle biologique du toxoplasme	23
II.1.2. Importance de la toxoplasmose	24
II.2. Réponse immunitaire des ovins contre <i>Toxoplasma gondii</i>	26
II.2.1. Réponse cellulaire	26
II.2.2. Réponse humorale	29
II.3. Vaccination avec la souche vivante atténuée S48	30
II.4. Variabilité de la sensibilité et de la résistance à la toxoplasmose en fonction des hôtes	31
<b>III. Comparaison des réponses immunitaires induites par <i>Toxoplasma gondii</i> et par <i>Staphylococcus aureus</i></b>	<b>32</b>
III.1. L'initiation de la réponse immunitaire contre les mammites et contre <i>T. gondii</i> fait intervenir le même type de récepteurs aux pathogènes	32
III.1.1. Importance de l'immunité innée au début d'une infection	32
III.1.2. TLRs impliqués dans la reconnaissance de <i>T. gondii</i> et des staphylocoques	33
III.2. Similitudes et différences entre les réponses immunitaires provoquées par <i>Toxoplasma</i> et <i>Staphylococcus</i>	36

## **B. DEUXIEME PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE 39**

<b>I. Matériel et méthodes</b>	<b>39</b>
I.1. Animaux	39
I.2. Protocole expérimental	41
I.3. Dosage des anticorps par ELISA	41
<b>II. Résultats</b>	<b>42</b>
II.1. Cinétique de la réponse anticorps	42
II.2. Comparaison entre les deux lignées	45
II.3. Analyse de l'effet « génération » et de l'effet « père »	46
II.3.1. Effet « génération »	46
II.3.2. Effet « père »	49
<b>III. Discussion</b>	<b>52</b>
III.1. Le vaccin Toxovax induit une production d'anticorps détectable pendant au moins un an	52
III.2. La sélection pour une résistance accrue aux mammites ne modifient pas la réponse anticorps vis-à-vis de <i>T. gondii</i>	53
III.3. Evaluation du contrôle génétique de la réponse à la vaccination contre la toxoplasmose	56

## **CONCLUSION 59**

## **BIBLIOGRAPHIE 61**

# TABLE DES ILLUSTRATIONS

## Figures

<b>Figure 1.</b> Indexations des reproducteurs et obtention des deux lignées CCS+ et CCS-, d'après Rupp (2009) et Pfeiffer (2007).....	21
<b>Figure 2.</b> Cycle biologique de <i>Toxoplasma gondii</i> , d'après (Buxton, 1998) et (Esteban-Redondo and Innes, 1997).....	24
<b>Figure 3.</b> Tableau clinique de la toxoplasmose chez la brebis en fonction du stade de gestation d'après (Buxton, 1998) et (Rodger and Buxton, 2006) .....	25
<b>Figure 4.</b> Cinétique de la réponse de l'hôte lors d'une primo-infection à <i>Toxoplasma gondii</i> , dans la lymphe efférente, d'après (Innes and Wastling, 1995a) .....	27
<b>Figure 5.</b> Exemple de courbe du standard .....	42
<b>Figure 6.</b> Evolution du taux d'anticorps (IgG) anti- <i>T. gondii</i> dans les 3 mois suivants l'injection de tachyzoïtes vivants S48.....	43
<b>Figure 7.</b> Evolution du taux d'anticorps (IgG) anti- <i>T. gondii</i> l'année qui suit l'injection de tachyzoïtes vivants S48 .....	44
<b>Figure 8.</b> Comparaison des titres anticorps des brebis des lignées « CCS+ » et « CCS- » après l'injection du vaccin S48.....	45
<b>Figure 9.</b> Comparaison de la réponse anticorps des brebis de génération 1 et 2 de la lignée « CCS+ » après injection du vaccin S48 .....	47
<b>Figure 10.</b> Comparaison de la réponse anticorps des brebis de génération de sélection 1 et 2 de la lignée « CCS- » après injection du vaccin S48 .....	48
<b>Figure 11.</b> Différence de sécrétion d'IgG anti- <i>T. gondii</i> entre les deux générations d'animaux .....	49

<b>Figure 12.</b> Comparaison des taux d'IgG anti- <i>T. gondii</i> des filles des béliers 5 et 7 par rapport à la moyenne des brebis « CCS -».....	50
<b>Figure 13.</b> Comparaison des taux d'anticorps moyens des filles des différents béliers à J30.	51
<b>Figure 14.</b> Les réponses immunitaires innées et acquises face à des infections sont contrôlées de manière complexe et polygénique par des QTLs (Quantitative trait loci) codant à la fois pour des gènes de structures et de régulations (Wilkie and Mallard, 1999) .....	55

## Tableaux

<b>Tableau 1.</b> Principales ressemblances et différences des réponses immunitaires contre <i>T. gondii</i> et contre <i>S. aureus</i> .....	36
<b>Tableau 2.</b> Filiations et générations des agnelles du millésime 2007.....	40
<b>Tableau 3.</b> Titres en anticorps anti- <i>T. gondii</i> moyens et écarts-type dans les deux lignées de brebis et résultats de l'analyse statistique (Test de Student) à chaque date de prélèvement .....	46
<b>Tableau 4.</b> Titres en anticorps anti- <i>T. gondii</i> moyens et écarts-type dans les deux générations de chaque lignée de brebis et résultats de l'analyse de variance à chaque date de prélèvement .....	48
<b>Tableau 5.</b> Taux d'IgG anti- <i>T. gondii</i> moyen chez les filles de la lignée « CCS -» de J30 à J370 après l'injection vaccinale .....	50

## **INTRODUCTION**

Les infections mammaires ont une importance majeure en élevage laitier, tant sur le plan sanitaire qu'économique. De nombreuses mesures de maîtrise ont déjà été mises en œuvre dans les élevages, notamment des mesures zootechniques adaptées aux différentes espèces laitières : bovine, caprine ou ovine. Néanmoins, ces mesures ne sont pas toujours suffisantes et l'incidence des mammites reste globalement élevée. La possibilité d'intervenir plus en amont, sur la génétique même de l'animal, est maintenant envisagée. En effet, la sélection génétique est déjà largement utilisée en élevage : elle a permis notamment d'améliorer les performances de production (Dodds et al., 2007; Haenlein, 2007), mais aussi la résistance à certaines maladies, comme par exemple la tremblante chez les ovins (Bishop and Morris, 2007). Il semble donc naturel de vouloir sélectionner des animaux pour une meilleure résistance aux mammites, du moins d'en évaluer la faisabilité.

Dans ce but, une sélection indirecte, basée sur les comptages de cellules somatiques (CCS) dans le lait a été mise en place chez les ruminants laitiers (Barillet, 2007; Bishop and Morris, 2007; Dekkers et al., 1994; Rupp and Boichard, 2003; Shook and Schutz, 1994). Une équipe de l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) a créé, par sélection divergente, deux lignées de brebis dont la sensibilité aux mammites est très différente. Une fois la faisabilité de cette sélection démontrée, une question fondamentale se pose : la sélection génétique qui permet d'améliorer la résistance aux infections mammaires des brebis induit-elle une détérioration de la capacité de réponse des animaux à d'autres maladies, dont l'importance en élevage peut être tout aussi capitale ? Une première étude a montré que la résistance des brebis au parasite digestif *Haemonchus contortus* n'a pas été altérée par la sélection. Nous souhaitons évaluer maintenant l'effet de cette sélection sur la réponse immunitaire des brebis vis-à-vis de *Toxoplasma gondii*.

Il est important d'étudier la toxoplasmose, d'une part car il s'agit d'une zoonose majeure, d'autre part parce qu'elle a une importance économique très significative en élevage ovin puisqu'elle provoque l'avortement. En outre, il existe des similitudes entre les effecteurs de la réponse immunitaire à *Toxoplasma gondii* et les effecteurs de la réponse à certains agents pathogènes responsables de mammites chez les petits ruminants, notamment *Staphylococcus aureus*.



Dans cette étude, nous avons évalué les capacités de réponse après une injection de tachyzoïtes vivants de la souche S48, aux brebis de deux lignées, l'une sensible et l'autre plus résistante aux mammites, à travers le suivi de la réponse anticorps anti-*Toxoplasma gondii*. L'objectif est de voir si les modalités de réponse diffèrent d'une lignée de brebis à l'autre. Par ailleurs, le second intérêt de notre étude est d'affiner les connaissances sur les modalités de la réponse humorale vis-à-vis de ce vaccin pour mieux connaître la cinétique de la réponse anticorps, sur une année après l'administration du vaccin Ovilis® Toxovax (Intervet), qui contient la souche S48.

## **A. PREMIERE PARTIE : CONTEXTE DE L'ETUDE**

### **I. Sélection génétique pour une résistance accrue aux infections mammaires**

#### **I.1. Importance des infections mammaires et de leur maîtrise en élevage ovin laitier**

##### **I.1.1. Les infections mammaires, un problème majeur en élevage laitier**

Les infections mammaires ont une importance majeure en élevage laitier, tant sur le plan sanitaire qu'économique. En effet, elles ont un impact non seulement direct, à cause des pénalités sur le paiement du lait ainsi que le coût des traitements, mais aussi indirect, en raison d'une diminution de la production laitière et d'une réforme anticipée des animaux. Par ailleurs, elles ont aussi des conséquences sur la transformation fromagère, car outre la présence possible de germes pathogènes ou de toxines, les infections mammaires se traduisent principalement par une modification de la fraction soluble du lait avec une augmentation de pH, de la fraction minérale et des protéines solubles (Pirisi et al., 2007; Raynal-Ljutovac et al., 2007). Enfin dans le contexte actuel de sécurisation des filières laitières par rapport à la Santé Publique, la maîtrise des infections mammaires est un enjeu de taille pour les éleveurs de brebis laitières.

##### **I.1.2. Les moyens de lutte contre les infections mammaires**

Depuis le milieu des années 90, en élevage ovin laitier, des mesures efficaces pour contrôler les infections mammaires ont été prises. Chez la brebis laitière, les mammites sont majoritairement dues à des staphylocoques : *Staphylococcus aureus* qui provoque essentiellement des mammites cliniques et les staphylocoques coagulase négative pour les mammites subcliniques (Bergonier et al., 2003; Mavrogenis et al., 1995). Les sources d'infections sont donc essentiellement cutanéomammaires et la transmission se fait surtout pendant la traite. Les mesures de lutte contre les infections mammaires ont donc porté d'une part, sur l'élimination des sources, qui consiste à réformer précocement les brebis atteintes de mammites cliniques et à traiter celles atteintes de mammites subcliniques avec une

antibiothérapie intramammaire ciblée, d'autre part sur une diminution de la transmission des germes basée sur une optimisation de la traite, un contrôle annuel de la machine à traire et une antiseptie des trayons en fin de traite (Bergonier and Berthelot, 2003; Contreras et al., 2007). A ces mesures peuvent se rajouter une vérification du plan alimentaire et du rationnement et, en dernier lieu, une évaluation des locaux d'élevage.

Ces méthodes de lutte ont permis un réel progrès dans les élevages ; cependant, elles ne sont pas toujours suffisantes. Des vaccins antistaphylococciques et des autovaccins ont été expérimentés mais ils n'ont pas donné de résultats significatifs. Une autre approche, plus récente, consiste à sélectionner les ruminants laitiers pour une meilleure résistance aux infections mammaires. En agissant de façon complémentaire avec les mesures de maîtrise déjà appliquées, la sélection sur ce critère permettrait, non seulement de diminuer l'incidence des mammites, mais aussi de limiter le recours aux médicaments anti-infectieux (Shook, 1989). Ainsi, la sélection génétique apparaît comme un nouvel outil de lutte contre les mammites en production laitière ovine.

## **I.2. Sélection génétique sur le critère CCS**

### **I.2.1. Sélection génétique pour une meilleure résistance aux maladies**

Déjà largement utilisée pour améliorer les performances de production des animaux, la sélection génétique s'intéresse maintenant à la résistance aux maladies. Pour de nombreuses maladies, une composante génétique de la variabilité de la sensibilité aux infections a été mise en évidence (Bishop and Morris, 2007; Shook, 1989). Ces différences entre animaux permettent d'envisager de les sélectionner pour accroître la résistance (Bishop and Morris, 2007).

Avant de sélectionner des animaux sur la résistance aux maladies, il est essentiel de s'interroger sur les points suivants : la sélection doit être faisable, durable, et souhaitée (Stear et al., 2001). La faisabilité dépend, d'une part de la variabilité génétique entre les individus sur le critère de sélection choisi, d'autre part de l'héritabilité de ce critère. Concernant la durabilité, Stear (Stear et al., 2001) a montré que sous la pression de la sélection naturelle, la résistance aux maladies parasitaires, qu'elle soit délibérée ou non, est stable. Enfin, la sélection doit répondre aux attentes des éleveurs, entendons par là qu'elle doit non seulement

se faire sur un critère économiquement intéressant -ou qu'elle permet de réduire les coûts de production- mais elle doit aussi ne pas se faire aux dépens d'autres critères importants pour la production (Shook, 1989; Stear et al., 2001). Par exemple, il existe une corrélation négative entre la production laitière et la résistance aux mammites : en effet, une sélection sur la production laitière a conduit à une plus grande sensibilité aux mammites chez la vache (Dekkers et al., 1994; Strandberg and Shook, 1989), ainsi qu'à une modification de la conformation mammaire chez la brebis, avec une mamelle dont les attaches sont moins solides, la rendant de ce fait plus difficile à traire et peut-être plus sensible aux infections (Barillet, 2007).

### **I.2.2. Sélection génétique pour la résistance aux mammites**

Réduire le coût de production du lait, diminuer le nombre de réformes prématurées des animaux et augmenter ainsi leur longévité, augmenter la qualité du lait et des produits laitiers et enfin améliorer la santé et le bien-être animal sont les raisons qui conduisent à inclure la résistance aux mammites dans les critères de sélection génétique.

#### **Choix du critère CCS**

Afin d'améliorer la résistance aux infections mammaires des brebis, une sélection indirecte, basée sur les comptages de cellules somatiques (ou CCS) dans le lait a été décidée et appliquée depuis 2006.

Les cellules somatiques sont présentes physiologiquement dans le lait de brebis et sont essentiellement, lorsque la bactériologie est négative, des macrophages, des granulocytes neutrophiles et des lymphocytes (Bergonier et al., 2003). Une augmentation du nombre de cellules dans le lait traduit la présence d'une inflammation de la glande mammaire en réponse à une infection. Les proportions cellulaires sont alors modifiées et les neutrophiles deviennent largement prédominants (Oviedo-Boyso et al., 2007). Chez la brebis, les infections mammaires sont majoritairement indétectables à l'examen clinique. Il s'agit donc de mammites subcliniques, diagnostiquées principalement de manière indirecte grâce à un indicateur fiable et peu coûteux: le CCS. Les mammites subcliniques peuvent aussi être diagnostiquées directement par la bactériologie ; néanmoins les isolements sont onéreux et difficilement réalisables en routine et à grande échelle.

Les mammites cliniques sont peu fréquentes chez la brebis (de l'ordre de 5%) contrairement à la vache. De surcroît, à l'exception de la Scandinavie, peu de pays enregistrent correctement les données concernant les mammites cliniques en élevage laitier. En revanche, les CCS individuels sont des données faciles à obtenir, grâce notamment aux données du Contrôle Laitier. Par ailleurs, les mammites cliniques sont un indicateur plus subjectif que le nombre de cellules somatiques présentes dans le lait (Shook and Schutz, 1994). Il existe une linéarité entre le nombre de mammites cliniques et les CCS, et la corrélation génétique entre les deux est proche d'une unité. Enfin, l'héritabilité du critère CCS est supérieure à celle des mammites cliniques : 0,15 pour les CCS contre 0,02 pour les mammites cliniques quelles que soient les espèces (Barillet et al., 2001; Philipsson et al., 1995; Rupp and Boichard, 2003; Rupp et al., 2003). Ainsi, une sélection indirecte sera plus efficace qu'une sélection directe seule. Toutes ces raisons confirment que le choix du critère CCS pour sélectionner des brebis sur la résistance aux infections mammaires semble judicieux.

### **Mise en place d'une sélection divergente**

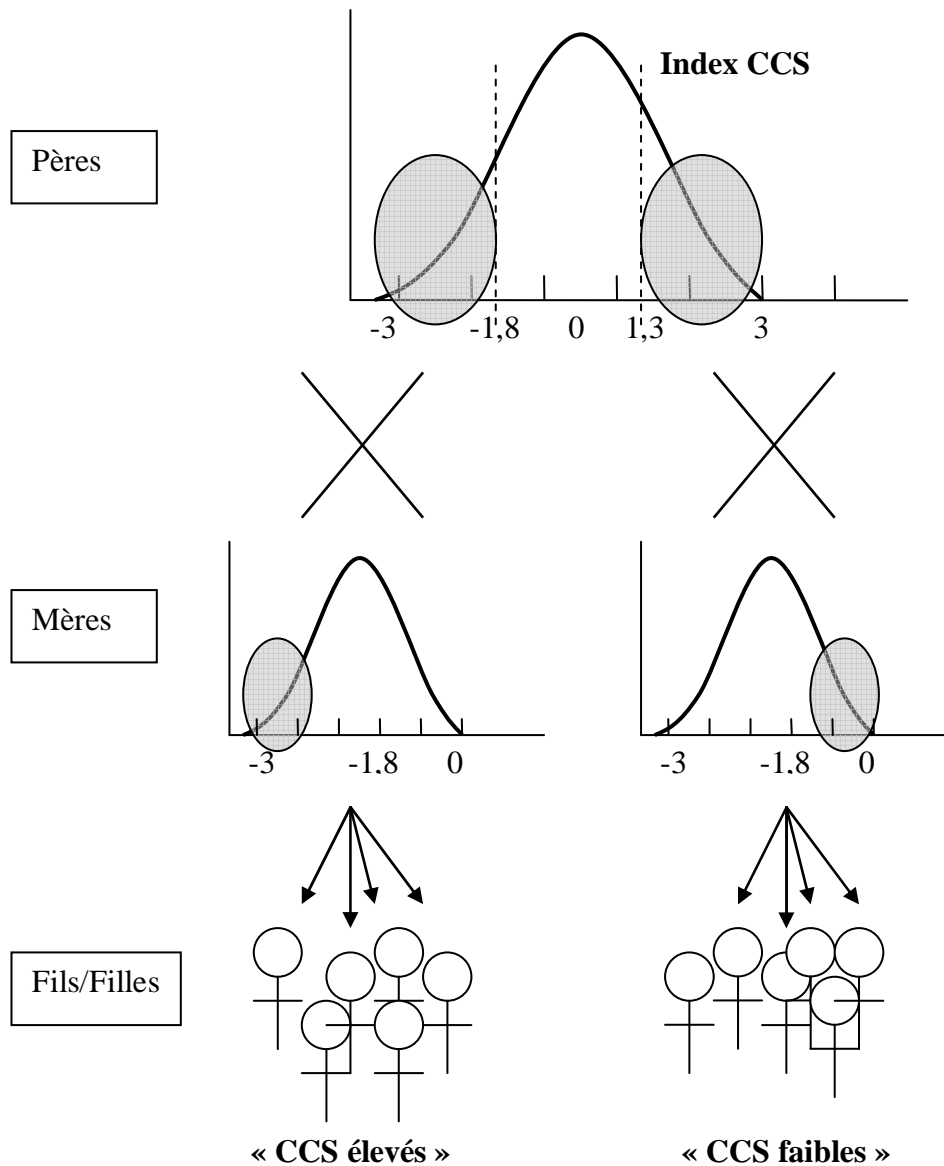
Une équipe de la Station d'Amélioration Génétique des Animaux (SAGA) de l'INRA (Institut National de la Recherche Agronomique) a créé deux lignées de brebis laitières de race Lacaune par sélection divergente sur le critère CCS. La sélection a débuté en 2003 à la ferme expérimentale de La Fage à Roquefort. Des béliers appartenant aux unités de sélection de la race Lacaune ont été indexés grâce aux informations disponibles sur leurs descendance. Les index positifs sont favorables : ce sont les animaux avec de faibles CCS. Parmi ceux qui ont été retenus pour la création de ces lignées, les mâles dont la descendance a des CCS élevés ont un index CCS inférieur à -1,8 ; ceux appartenant à la lignée « CCS faibles » ont un index CCS supérieur à 1,3 avec une moyenne à 1,9.

D'autre part, les brebis de l'unité expérimentale ont été divisées en deux groupes en fonction de leurs index CCS. Ainsi, deux groupes de sept pères avec des valeurs d'index CCS extrêmes ont été croisés par insémination artificielle avec des femelles d'index CCS similaire (**Figure 1**). Par ailleurs, les béliers choisis avaient tous un index similaire et positif pour la production laitière (Rupp et al., 2009).

En conséquence, deux groupes d'index CCS théoriques différents, issus de ces croisements, ont été créés ; il s'agit du noyau de la sélection divergente à partir duquel

plusieurs générations vont être produites. Les filles obtenues appartiennent à deux groupes différents nommés « CCS faibles » ou CCS- et « CCS élevés » ou CCS+.

**Figure 1.** Indexations des reproducteurs et obtention des deux lignées CCS+ et CCS-, d'après Rupp (2009) et Pfeiffer (2007)



**Une sélection sur le critère CCS augmente la résistance des brebis aux mammites**

Rupp et collègues ont montré que les filles de la lignée « CCS faibles » et celles de la lignée « CCS élevés » n'avaient pas la même sensibilité aux mammites, que celles-ci soient

cliniques ou subcliniques. En effet, au cours de la première lactation, tous les cas de mammites cliniques ont été diagnostiqués chez des brebis CCS+. De plus la fréquence des mammites cliniques chroniques, à l'origine de la formation d'abcès dans le parenchyme mammaire détectés par palpation, est aussi plus élevée dans cette lignée. Enfin, la prévalence des infections intra-mammaires, évaluées par des examens bactériologiques, est aussi plus élevée chez les animaux dont les CCS sont élevés.

Par conséquent, la meilleure résistance des brebis « CCS- » est principalement caractérisée par une plus forte capacité à, dans un premier temps, limiter les infections intra-mammaires, notamment pendant la période *peri partum*, dans un second temps, à éliminer les infections pendant la lactation, et troisièmement, à limiter quantitativement le processus inflammatoire et ses conséquences cliniques (Rupp et al., 2009).

### **I.3. Problème de la détérioration d'autres critères à la suite d'une sélection génétique**

Nous avons vu précédemment qu'avant de mettre en place un plan de sélection, il faut s'assurer que celle-ci est à la fois durable, faisable et souhaitable. Les deux premiers points sont vérifiés, il nous reste désormais à prêter une attention particulière aux conséquences défavorables qu'une sélection sur la résistance aux mammites pourrait avoir sur la sensibilité à d'autres maladies.

Selon Stear (Stear et al., 2001), sélectionner pour une résistance à une maladie spécifique pourrait prédisposer les animaux à préférer un type de réponse immunitaire par rapport à un autre. Les infections intra-mammaires sont dues à des bactéries et elles entraînent essentiellement une réponse immunitaire à médiation cellulaire, de type Th1 ou Th17. Ainsi des brebis sélectionnées pour leur résistance aux mammites seraient peut-être plus enclines à développer une réponse immunitaire de ces phénotypes, plutôt qu'une réponse Th2 dont on sait qu'elle promeut assez fortement la réponse humorale.

Néanmoins, l'étude de Pfeiffer (2007) a montré que les deux lignées d'ovins « CCS élevés » et « CCS faibles », à la suite d'une infestation massive par *Haemonchus contortus* ont une excrétion fécale, des niveaux d'installation et de reproduction du parasite très similaires. Or *Haemonchus contortus* est un parasite qui induit principalement une réponse

immunitaire de type Th2. Ainsi, la sélection pour une résistance accrue aux mammites n'entraîne pas de différence de résistance à l'infestation par *Haemonchus contortus*. Cependant des différences entre les deux groupes « CCS élevés » et « CCS faibles » ont été observées lors de la mobilisation de certains effecteurs immunitaires. Effectivement, les moutons « CCS faibles » ont, à plusieurs reprises et dès la première infestation, un nombre plus faible de lymphocytes T CD8+, ainsi qu'un ratio CD4/CD8 plus élevé que le groupe « CCS élevés ». De plus, le recrutement des lymphocytes B est plus marqué chez le groupe « CCS faibles » (Pfeiffer, 2007).

La sélection sur le critère CCS a donc modifié les capacités de réponse immunitaire des animaux. C'est pourquoi il est intéressant de comparer la réaction des deux lignées de brebis face à d'autres maladies. L'objectif de notre étude est de déterminer si la sélection sur le critère CCS a une influence sur la réponse immunitaire associée à une infection par *Toxoplasma gondii*.

## **II. La toxoplasmose chez les ovins et la réponse immunitaire de l'hôte**

### **II.1. Epidémiologie et importance de la toxoplasmose**

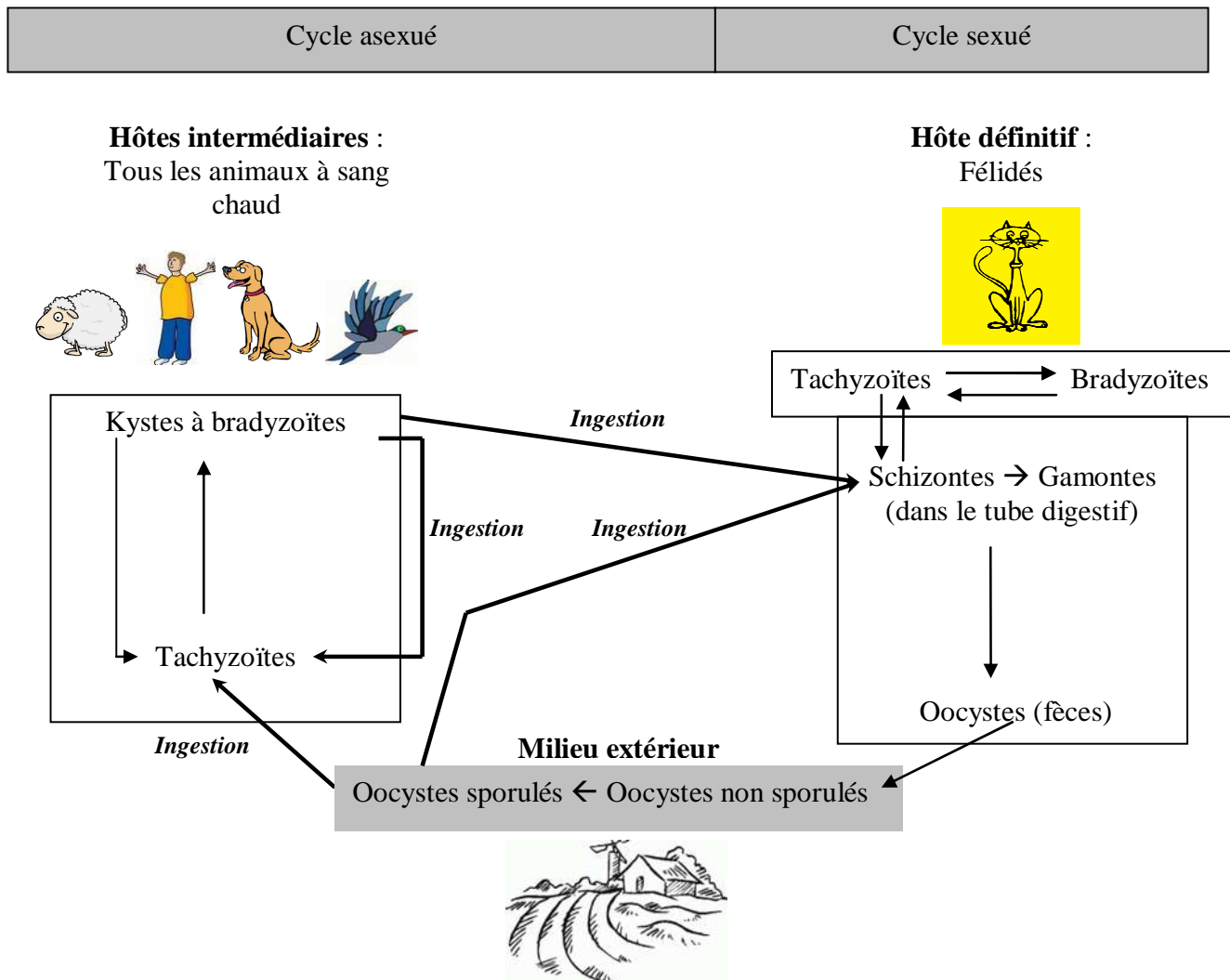
#### **II.1.1. Cycle biologique du toxoplasme**

*Toxoplasma gondii* est un protozoaire intracellulaire obligatoire. Le cycle du parasite est hétéroxène et comprend deux phases : une sexuée et l'autre asexuée. Le cycle sexué se produit exclusivement dans l'épithélium intestinal des Félinés et aboutit à la production d'oocystes (**Figure 2**). Les hôtes intermédiaires se contaminent donc en ingérant des aliments souillés par des fèces de chats, eux-mêmes contaminés et excréteurs (Plant et al., 1974). Le cycle asexué a une faible spécificité d'hôte et peut avoir lieu chez tous les mammifères et les oiseaux. Au cours de cette seconde phase du cycle, deux formes du parasite se succèdent : le tachyzoïte, et le bradyzoïte qui est la forme de résistance du toxoplasme. Une fois qu'ils ont pénétrés dans les cellules de l'hôte, les tachyzoïtes se multiplient activement jusqu'à ce que l'hôte développe une immunité contre le parasite. Une infection persistante se met alors en place : les parasites extracellulaires sont éliminés, les multiplications intracellulaires



ralentissent et des kystes se développent. Le toxoplasme persiste dans l'organisme hôte sous forme de bradyzoïtes enkystés dans les muscles ou le cerveau. La contamination d'un nouvel hôte, intermédiaire ou définitif, se fait par ingestion des kystes à bradyzoïtes (Buxton, 1998; Esteban-Redondo and Innes, 1997; Uggla and Buxton, 1990).

**Figure 2.** Cycle biologique de *Toxoplasma gondii*, d'après (Buxton, 1998) et (Esteban-Redondo and Innes, 1997)



## II.1.2. Importance de la toxoplasmose

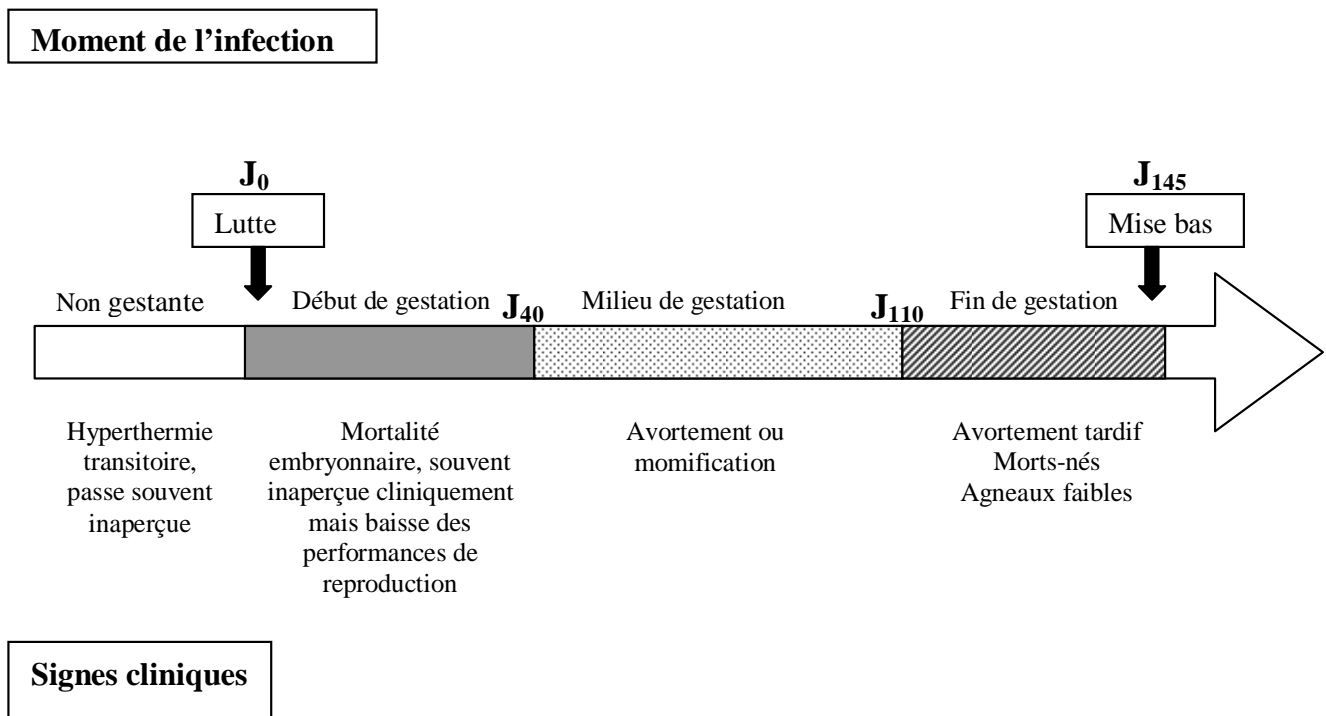
### Importance médicale et économique : la toxoplasmose ovine

La toxoplasmose est une cause majeure d'avortements chez les ovins, et elle est présente dans tous les pays du monde. Cette maladie parasitaire est aussi responsable de baisses des performances de reproduction, de résorptions fœtales, de momifications, de

mortinatalité et de mortalité néonatales (Innes et al., 2007). La toxoplasmose entraîne donc des pertes économiques élevées dans les élevages ovins.

Cependant, la maladie est bénigne si les ookystes sont ingérés par une brebis non gestante. La brebis héberge alors des bradyzoïtes et s'immunise. Si la brebis est gestante, les conséquences de l'infection peuvent devenir sévères (Owen et al., 1998) et sa manifestation clinique dépend du stade de gestation (**Figure 3**). La maladie peut se manifester par de l'infertilité si l'infection a lieu au début de la gestation. Dans tous les cas, la brebis s'immunise de façon durable, après la première infection.

**Figure 3.** Tableau clinique de la toxoplasmose chez la brebis en fonction du stade de gestation d'après (Buxton, 1998) et (Rodger and Buxton, 2006)



### Importance sanitaire : la toxoplasmose est une zoonose majeure

La contamination de l'homme dépend du mode de vie et des habitudes alimentaires (Tenter et al., 2000). En effet, l'homme peut être contaminé en ingérant des ookystes rejetés par les chats ou en consommant de la viande ou des viscères peu cuites et contenant des kystes à bradyzoïtes, ou encore en consommant du lait non pasteurisé d'animaux infectés (Dubey, 1994). Souvent bénigne, la toxoplasmose peut parfois être très grave, essentiellement

chez les personnes immunodéprimées. La contamination d'une femme enceinte, si elle a lieu à un stade précoce de la grossesse, peut conduire à un avortement. A un stade plus avancé, l'enfant peut naître viable mais développer des lésions oculaires et nerveuses. Il s'en suit donc un retard mental ou une perte de la vision dans les premières années de vie. La toxoplasmose est aussi mortelle chez des personnes qui ont un syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) ou chez des patients sous traitements immunosuppresseurs, suite à une transplantation d'organe ou pendant une chimiothérapie à cause d'un cancer par exemple (Dubey, 1994).

En conclusion, la toxoplasmose est une maladie essentielle à étudier car outre son importance économique en élevage, elle a aussi une importance sanitaire puisqu'il s'agit d'une zoonose dont les conséquences sont majeures.

## **II.2. Réponse immunitaire des ovins contre *Toxoplasma gondii***

### **II.2.1. Réponse cellulaire**

*Toxoplasma gondii* est un parasite intracellulaire, la réponse immunitaire à médiation cellulaire, dite de type Th1, semble donc être la plus adaptée et la plus protectrice des modalités de réponse immunitaire, notamment lors d'une primo-infection (Innes et al., 2007).

#### **Effecteurs de la réponse immunitaire cellulaire et leurs cinétiques**

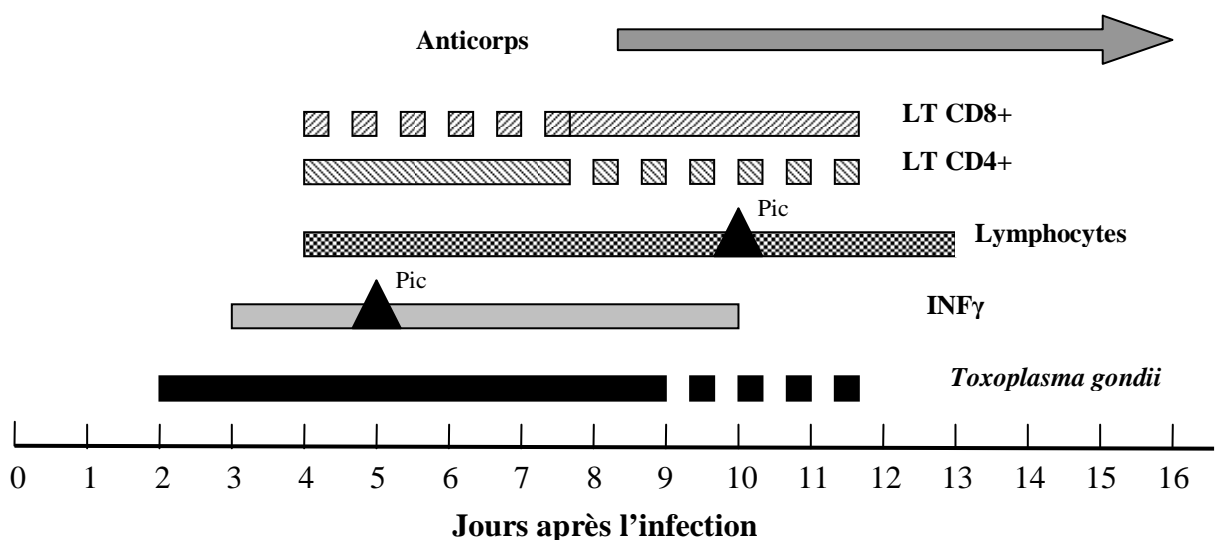
Des études utilisant la technique de cannulation lymphatique ont permis d'examiner directement la nature des effecteurs de la réponse immunitaire contre *Toxoplasma gondii*, ainsi que la cinétique d'apparition de ces effecteurs chez les ovins (Innes and Wastling, 1995b). Ainsi, après inoculation de tachyzoïtes, l'interféron gamma (IFN $\gamma$ ) est produit très précocement. Des IFN biologiquement actifs sont détectables dans la lymphe dès 48 à 96 heures après une primo-infection et ils persistent dans la lymphe pendant 6 à 9 jours. Un pic d'IFN $\gamma$  se produit 3 à 5 jours après l'inoculation (Innes et al., 1995b) (**Figure 4**). Chez la souris, *Toxoplasma gondii* est capable d'activer directement les macrophages qui produisent TNF $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor) et interleukine 12 (IL-12), cytokine qui joue un rôle pivot dans la production d'IFN $\gamma$ . *In vitro*, l'IFN $\gamma$  inhibe la multiplication intracellulaire du tachyzoïte dans les fibroblastes et les macrophages. De plus, l'IFN $\gamma$  est indispensable pour

fournir un microenvironnement de cytokines favorables à l'induction d'une réponse immunitaire adaptée, de type Th1 (Innes, 1997).

L'IFN $\gamma$  est produit essentiellement par les lymphocytes T (LT) CD4+ mais aussi par les LT CD8+. Après une primo-infection, les premiers lymphocytes à être produits sont les LT CD4+. Au dixième jour après l'inoculation, il y a un pic de lymphocytes (Uggla and Buxton, 1990): 50% des cellules présentes dans la lymphe efférente sont des lymphocytes. Les LT CD8+ deviennent alors prédominants (**Figure 4**). Le ratio CD4/CD8 diminue lorsque le nombre de LT spécifiques augmente (Innes et al., 1995a). Les LT CD8+ sont stimulés par l'interleukine 2 (IL-2) produite par les LT CD4+. Le parasite est présent dans la lymphe du deuxième au douzième jour après la primo-infection, mais sa quantité diminue considérablement à partir du neuvième ou dixième jour, conjointement à l'augmentation de la population lymphocytaire (Buxton et al., 1994). Les LT CD4+ et surtout CD8+ inhibent la multiplication intracellulaire des tachyzoïtes *in vitro*.

L'activité cytotoxique contre les cellules infectées par le toxoplasme est attribuée aux LT CD8+ qui ont besoin de la présentation par les molécules CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité) de classe I d'un peptide antigénique pour être activés (Innes et al., 1995a).

**Figure 4.** Cinétique de la réponse de l'hôte lors d'une primo-infection à *Toxoplasma gondii*, dans la lymphe efférente, d'après (Innes and Wastling, 1995a)



Par conséquent, chez les ovins comme chez la souris, à l'inverse de l'homme, le lymphocyte T CD8+ a un rôle protecteur prédominant lors d'une infection à *Toxoplasma gondii* (Parker et al., 1991; Purner et al., 1996). La cytokine clef qui va être sécrétée précocement et intervenir dans la résistance de l'hôte est l'INF $\gamma$ . Afin que la protection immunitaire soit la plus efficace possible, il y a donc une action synergique des effecteurs et notamment des LT CD4+, CD8+ et de l'INF $\gamma$ . Sous la pression de cette réponse immunitaire, le parasite change de forme biologique, et s'enkyste.

### **Mécanismes intracytoplasmiques induits par l'INF $\gamma$**

*Toxoplasma gondii* est un parasite intracellulaire obligatoire et après une pénétration active dans les cellules de l'hôte, les tachyzoïtes se multiplient rapidement dans une vacuole parasitophore. Cette vacuole résiste à la fusion avec les vésicules du système endo-lysosomal mais elle permet la circulation des nutriments et des métabolites de la cellule hôte vers le parasite et, inversement, la sécrétion de facteurs qui contrôle le maintien de la vacuole, du parasite vers la cellule hôte.

Comme nous l'avons vu précédemment, l'INF $\gamma$  est une cytokine qui a un rôle majeur dans la résistance de l'hôte à *T. gondii*. L'INF $\gamma$  induit notamment un programme de transcription complexe dont le premier médiateur est le facteur de transcription STAT-1. La plupart des facteurs régulés par l'INF $\gamma$  sont dépendants de STAT-1 et comprennent les trois enzymes suivantes : iNOS (*inducible nitric oxide synthase*), IGTP (*interferon-inducible GTPase*) et IDO (indole-amine 2,3-dioxygénase) (Yap et al., 2006).

iNos est une enzyme capable de catalyser la formation d'oxyde nitrique à partir de L-arginine. L'expression d'iNOS par les macrophages nécessite l'activation combinée d'INF $\gamma$  et de TNF $\alpha$ . L'oxyde nitrique formé inhiberait alors le métabolisme des mitochondries et de certaines enzymes, essentiels à la réplication et à la respiration du parasite. Néanmoins, des souris déficientes pour iNOS survivent à une infection aiguë par *T. gondii* (Suzuki, 2002). D'autres facteurs intracytoplasmiques, indépendants d'iNOS jouent donc un rôle important dans la résistance de l'hôte au toxoplasme : IGTP et IDO.

IGTP est une autre des enzymes induites par l'INF $\gamma$ , qui est impliquée dans la résistance cellulaire. Les IGTP proviennent de la famille de GTPases p47 qui ont été localisées dans le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi et la membrane des

phagosomes. Ainsi les IGTP s'associeraient avec la membrane de la vacuole parasitophore, favorisant ainsi sa dégradation par les lysosomes (Yap et al., 2006).

L'INF $\gamma$  est aussi responsable d'une autre activité anti-toxoplasme dans les cellules, via l'activation de l'IDO. Cette enzyme rompt le cycle aromatique du L-tryptophane. Elle prive ainsi la cellule hôte mais aussi le parasite, d'un acide aminé essentiel, compromettant de cette façon, le métabolisme du toxoplasme (Bhopale, 2003).

## II.2.2. Réponse humorale

Après une primo-infection, naturelle ou expérimentale, par *Toxoplasma gondii*, le titre d'anticorps spécifiques est détectable dans la lymphe dès 7 à 8 jours, et il augmente significativement durant les 2 à 3 semaines qui suivent l'infection (Blewett et al., 1983). La persistance des anticorps après une infection naturelle semble être longue : les anticorps restent détectables pendant plusieurs années. En revanche, lors d'infection expérimentale avec des tachyzoïtes vivants, les résultats sont variables suivant les études, et le titre anticorps semble diminuer plus rapidement (Buxton et al., 1991).

Les immunoglobulines M sont les plus abondantes pendant le premier mois suivant une primo-infection. Au cours du second mois, les IgG deviennent la classe d'immunoglobulines prédominante (Blewett et al., 1983; Handman and Remington, 1980). Une analyse de la lymphe efférente par Western Blot montre que la réponse contre les tachyzoïtes de la souche S48 est dirigée contre un nombre relativement faible de groupes antigéniques, notamment à 32, 30, 24 et 11 kDa. L'antigène de 30 kDa est probablement la principale glycoprotéine de surface de *T. gondii*, désignée par les termes gp30 ou SAG-1 (Wastling et al., 1995). Gp30 est impliquée dans la stimulation des réponses immunitaires à la fois cellulaire et humorale chez la souris (Kasper and Khan, 1993).

Après une seconde infection avec des tachyzoïtes, le taux d'anticorps à proximité du site de l'infection atteint très rapidement de grandes concentrations, et les immunoglobulines sont détectables dans la lymphe dès 3 à 4 jours. Les anticorps semblent jouer un rôle clef dans le blocage de l'entrée des parasites dans les cellules, prévenant ainsi l'invasion cellulaire et la multiplication des tachyzoïtes (Innes and Wastling, 1995b; Wastling et al., 1995). Bien que la réponse cellulaire semble être celle qui confère le plus grand degré de protection lors d'une

primo-infection, au cours des infections suivantes, la réponse humorale paraît essentielle pour bloquer précocement l'invasion du parasite dans les cellules de l'hôte (Innes et al., 2007).

### **II.3. Vaccination avec la souche vivante atténuée S48**

L'immunité protectrice se met en place chez les ovins après une infection naturelle par *T. gondii*, ce qui suggérait d'entrée que le développement d'un vaccin efficace était un objectif atteignable. Cependant, les essais réalisés avec des tachyzoïtes inactivés ne donnent pas de résultats satisfaisants. D'autres études impliquant un antigène de surface du toxoplasme combiné avec un adjuvant ISCOM (*quil A, Immuno Stimulating COMpound*) avait donné des résultats encourageants chez la souris, qui développait une réponse immunitaire à la fois humorale et cellulaire. Néanmoins, l'infection de brebis gestantes et vaccinées a montré que, malgré une augmentation du taux d'anticorps circulants chez la brebis, les fœtus ne sont pas protégés ; la parasitémie chez les ovins vaccinés avec cet antigène est donc possible, et la protection du fœtus n'est pas suffisante (Buxton et al., 1989).

En 1988, le premier vaccin vivant destiné à contrôler la toxoplasmose ovine a été commercialisé en Nouvelle-Zélande (Toxovax). La préparation utilisée pour ce vaccin est la souche S48 qui a la particularité d'être incomplète, c'est-à-dire qu'elle a perdu sa capacité à former des kystes tissulaires. A l'origine, il s'agit de tachyzoïtes isolés à partir de cotylédons fœtaux d'une brebis ayant avorté. Les tachyzoïtes ont ensuite subi deux passages hebdomadaires par injection intra-péritonéale à des souris de laboratoire, environ 3000 fois avant de perdre leur capacité à développer des kystes à bradyzoïtes dans les tissus de l'hôte. La souche S48 est actuellement multipliée sur culture cellulaire Véro. Au cours de la vaccination, la toxoplasmose est limitée à un stade tachyzoïte et ce, de façon transitoire. Ainsi, ce vaccin peut être utilisé sur un animal destiné à la consommation humaine puisque son utilisation ne conduit pas à la production d'une viande contaminée par la souche vaccinale. De plus le cycle sexuel du parasite chez le chat ne peut être initié à partir des tachyzoïtes vaccinaux (Buxton, 1993; Buxton and Innes, 1995).

Plusieurs expériences ont ensuite été réalisées par le laboratoire Intervet qui commercialise le vaccin Toxovax, en collaboration avec l'Institut de Recherches du Moredun à Edinburgh (Ecosse), afin de prouver l'efficacité du vaccin. Deux lots de brebis gestantes,

l'un vacciné l'autre non, ont ingéré 2000 ookystes sporulés de *T. gondii*, ce qui correspond à une infestation majeure. Dans le lot non vacciné, 18% des agneaux seulement sont nés vivants et viables, alors que dans le lot vacciné, 75% des agneaux étaient vivants et viables, avec, de plus, un poids significativement supérieur à ceux du premier lot, ce qui augmente leurs chances de survie (Buxton and Innes, 1995). Par ailleurs, la protection induite par les tachyzoïtes de la souche de S48 est aussi efficace au bout de 18 mois qu'elle ne l'est six mois seulement après la vaccination (Buxton et al., 1993).

#### **II.4. Variabilité de la sensibilité et de la résistance à la toxoplasmose en fonction des hôtes**

Le parasite *T. gondii* est capable d'infecter toutes les espèces animales à sang chaud, néanmoins les conséquences de l'infection sont très variables d'une espèce à l'autre. La souris par exemple est très vulnérable aux conséquences de l'infection : elle développe une maladie aigüe. En revanche, l'infection est bénigne et transitoire chez les bovins et les cervidés, alors que chez les petits ruminants, *T. gondii* est responsable d'avortements et d'infections chroniques avec la formation de kystes à bradyzoïtes. Le rat et l'homme réagissent de façon similaires aux ovins et caprins (Esteban-Redondo and Innes, 1997; Innes, 1997; Ugglia and Buxton, 1990). Les mécanismes de prédisposition à la toxoplasmose sont mal connus. Des études pour approfondir ce sujet sont donc menées avec des modèles animaux comme la souris ou le rat. Ce dernier est une espèce modèle qui permet de reproduire assez bien la pathologie chez l'homme et chez les ovins.

Des études portant sur la génétique de l'hôte ont montré qu'une souche particulière de rat se comporte différemment des autres souches car il présente une résistance totale à l'infection par *T. gondii* : il s'agit du rat Lewis. L'absence d'anticorps anti-toxoplasme et de parasite, suite à l'infection, indique que la dissémination parasitaire est complètement prévenue dans cette souche. Cette résistance présente un caractère dominant puisqu'elle s'observe chez les rats hybrides de première génération, issus du croisement entre la souche Lewis et des souches sensibles (Sergent et al., 2005).

Une région contrôlant la résistance à l'infection toxoplasmique a été identifiée sur le chromosome 10. Ce locus a été baptisé *Toxo1*. Des études ont montré que la résistance ou la



sensibilité à la toxoplasmose dépend exclusivement de l'origine génomique de *ToxoI*, quelque soit par ailleurs le reste du génome. L'issue de l'infection toxoplasmique apparaît donc contrôlée par *ToxoI* selon un mode mendélien (Cavaillès et al., 2006).

Le mécanisme de résistance du rat Lewis a été en partie identifié, notamment au sein des macrophages. Les macrophages de la souche résistante Lewis inhibent la prolifération intracellulaire du parasite et sa dissémination, après la formation de la vacuole parasitophore. De plus, après une heure de contact avec les macrophages de la souche Lewis, les parasites extracellulaires perdent leur capacité à envahir des cellules naïves (Cavaillès et al., 2006). Le gène qui contrôle ce mécanisme est en cours d'identification.

### **III. Comparaison des réponses immunitaires induites par *Toxoplasma gondii* et par *Staphylococcus aureus***

#### **III.1. L'initiation de la réponse immunitaire contre les mammites et contre *T. gondii* fait intervenir le même type de récepteurs aux pathogènes**

##### **III.1.1. Importance de l'immunité innée au début d'une infection**

On distingue généralement deux mécanismes de défense différents qui servent à protéger un organisme: l'immunité innée et l'immunité acquise. L'immunité innée correspond à la capacité de l'organisme à répondre à une infection en l'absence de pré-exposition ; elle est rapide et non spécifique du pathogène. L'immunité acquise se développe plus lentement au cours d'une primo-infection mais elle est ensuite plus rapide lors des infections ultérieures grâce à l'intervention de cellules mémoires. Cette réponse est spécifique du pathogène qui l'a induite. Ces deux immunités, innée et acquise, sont étroitement liées et interagissent de manière synergique afin de lutter contre un pathogène donné. Tout d'abord l'immunité innée stimule la réponse immunitaire acquise et influence sa nature. Par ailleurs, la réponse immunitaire acquise fait intervenir de nombreux effecteurs de l'immunité innée pour éliminer les pathogènes et augmente ainsi leur activité antimicrobienne dans un grand nombre d'infections (Oviedo-Boyso et al., 2007).

L'immunité innée est prépondérante au début d'une infection : elle doit permettre la détection des pathogènes ainsi qu'une rapide activation des mécanismes de défense de l'hôte. Il existe une très grande variété de récepteurs dans le système immunitaire inné, qui vont permettre une large reconnaissance de molécules microbiennes tels certains lipides, acides nucléiques ou encore protéines. Les Toll-like récepteurs ou TLRs sont des éléments clés de l'immunité innée en raison de leur implication directe dans la mise en place d'une réponse appropriée. La fonction des TLRs est la reconnaissance de certaines structures appelées PAMPs ou *pathogen-associated molecular patterns*, qui sont des composants physiologiques des pathogènes et typiquement différents des molécules de l'hôte. De nombreux PAMPs ont déjà été caractérisés et leurs TLRs respectifs identifiés. Par exemple, le premier récepteur qui a été identifié a été le ligand du TLR4 : il s'agit du lipopolysaccharide, un composant essentiel des bactéries Gram négatives (Oviedo-Boyso et al., 2007; Yarovinsky and Sher, 2006).

### **III.1.2. TLRs impliqués dans la reconnaissance de *T. gondii* et des staphylocoques**

#### **TLRs impliqués dans la reconnaissance de *Toxoplasma gondii***

Nous avons vu précédemment que l'IFN $\gamma$  a un rôle essentiel dans la résistance de l'hôte à *Toxoplasma gondii*. Or la principale cytokine qui stimule une production précoce d'IFN $\gamma$  est l'interleukine 12 (IL-12). IL-12 est libérée par des cellules du système immunitaire inné : les cellules dendritiques, les macrophages et les neutrophiles. La libération d'IL-12 notamment par les cellules dendritiques est dépendante d'une protéine : MyD88 (Myeloïd Differentiation factor 88). MyD88 est une protéine adaptatrice, qui active la transduction du signal lié à la fixation du ligand sur le TLR. MyD88 a un rôle central puisqu'elle conduit à la production de cytokines pro-inflammatoires suite à l'activation de certains TLRs, et elle est indispensable dans le cadre de la résistance de l'hôte à *T. gondii* car elle permet la libération d'IL-12 (Kim et al., 2006; Yap et al., 2006; Yarovinsky and Sher, 2006).

A partir d'extraits de tachyzoïtes solubles, la protéine responsable de la libération d'IL-12 a été identifiée : il s'agit de la profiline. Chez d'autres eucaryotes, la profiline régule la polymérisation de l'actine. Pour *Toxoplasma gondii*, la profiline est indispensable à la virulence du parasite *in vivo*. En effet, cette molécule permet le glissement du tachyzoïte sur les cellules hôtes, l'invasion cellulaire, et enfin sa sortie (Yarovinsky, 2008). Le récepteur de

cette protéine est TLR11 chez la souris. TLR11 est un récepteur de la profiline, de *Toxoplasma gondii* et des autres protozoaires apicomplexiens intracellulaires, nécessaire à la production d'IL-12 par les cellules dendritiques, *in vitro* comme *in vivo* (Yarovinsky, 2008; Yarovinsky and Sher, 2006).

TLR11 n'est pas le seul récepteur à intervenir dans la réponse immunitaire contre *T. gondii*. TLR2 semble aussi avoir un rôle important dans la résistance de l'hôte, et notamment lorsque ce dernier est soumis à de fortes doses infectieuses. Premièrement, la production d'IL-12 par les macrophages est strictement dépendante de l'activation de TLR2. De plus TLR2 régule la production, induite par le toxoplasme, de chemokine ligand 2 (CCL2), une chimiokine qui attire les neutrophiles. Cette régulation de la production de CCL2 est d'autant plus importante que l'implication des neutrophiles dans la réponse immunitaire innée de l'hôte face au parasite, est grande. Le ligand de TLR2 est le glycosylphosphatidylinositol (GPI) présent en grande quantité dans les membranes du tachyzoïte (Kim et al., 2006; Yarovinsky, 2008; Yarovinsky and Sher, 2006). GPI est aussi le ligand d'un autre récepteur, le TLR4 qui semble coopérer avec TLR2 lors d'infections à *Toxoplasma gondii* (Yarovinsky, 2008).

### **TLRs impliqués dans la reconnaissance des staphylocoques**

TLR2 joue un rôle essentiel dans la reconnaissance de *Staphylococcus aureus*, principal agent des mammites cliniques chez les ovins. TLR2 est le récepteur qui reconnaît le plus grand nombre de molécules associées aux pathogènes ; il reconnaît notamment les acides lipotéichoïques des bactéries Gram positives (Fournier and Philpott, 2005; Kielian et al., 2005a; Weber et al., 2003). D'autre part, TLR2 est aussi capable de reconnaître les PSM (Phenol Soluble Modulin) présents à la fois chez *S. aureus* et *Staphylococcus epidermidis*, pathogène également responsable de mammites chez les petits ruminants (Fournier and Philpott, 2005). TLR1 et TLR6 sont deux autres récepteurs qui peuvent agir en synergie avec TLR2. En effet, en association avec TLR2, ils peuvent augmenter l'effet des PAMPs réputés se lier à TLR2 (Fournier and Philpott, 2005).

De même, TLR4 est impliqué dans la reconnaissance de pathogènes responsables de mammites. Après reconnaissance de *S. aureus*, TLR2 et TLR4 induisent l'activation de NF- $\kappa$ B, un facteur de transcription qui va réguler l'expression de nombreux gènes de défense

immunitaire et induire une réponse inflammatoire dans la mamelle en stimulant la production de facteurs pro-inflammatoires (Yang et al., 2008).

Le principal médiateur de la réponse émise par TLR2 après son activation est la protéine adaptatrice MyD88. MyD88 est essentielle à l'hôte pour fournir une réponse immunitaire contre *S. aureus*. D'autant plus que, lorsque la réponse est initiée par le récepteur de l'interleukine-1 (IL-1R), MyD88 agit comme médiateur du recrutement des neutrophiles (Bubeck Wardenburg et al., 2006; Kielian et al., 2007; Miller et al., 2006).

### III.2. Similitudes et différences entre les réponses immunitaires provoquées par *Toxoplasma* et *Staphylococcus*

*Tableau 1.* Principales ressemblances et différences des réponses immunitaires contre *T. gondii* et contre *S. aureus*

Effecteurs de la réponse immunitaire		Infection à <i>Toxoplasma gondii</i>	Infection à <i>Staphylococcus aureus</i>
Lymphocytes T	CD4+	(Buxton et al., 2007; Buxton et al., 1994; Innes et al., 1995a; Ugglà and Buxton, 1990)	(Oviedo-Boyso et al., 2007)
	CD8+		
Récepteurs	TLR11	(Kim et al., 2006; Yap et al., 2006; Yarovinsky, 2008; Yarovinsky and Sher, 2006)	
	TLR2	(Kim et al., 2006; Yarovinsky, 2008; Yarovinsky and Sher, 2006)	(Fournier and Philpott, 2005; Kielian et al., 2005a; Kielian et al., 2005b; Weber et al., 2003; Yang et al., 2008)
	TLR4	(Yarovinsky, 2008; Yarovinsky and Sher, 2006)	(Yang et al., 2008)
	IL1-R		(Bubeck Wardenburg et al., 2006; Kielian et al., 2007; Miller et al., 2006)
Adaptateur	MyD88	(Kim et al., 2006; Yap et al., 2006; Yarovinsky and Sher, 2006)	(Bubeck Wardenburg et al., 2006; Kielian et al., 2007; Miller et al., 2006)
Cytokines	IL-1 $\beta$		(Fournier and Philpott, 2005; Lahouassa et al., 2007; Oviedo-Boyso et al., 2007)
	IL-8		
	IL-12	(Kim et al., 2006; Yap et al., 2006; Yarovinsky and Sher, 2006)	(Fournier and Philpott, 2005; Oviedo-Boyso et al., 2007)
	IL-17		(Chung et al., 2003; Kielian et al., 2005b)
	TNF $\alpha$	(Buxton et al., 2007; Innes, 1997)	(Lahouassa et al., 2007; Oviedo-Boyso et al., 2007; Sasaki et al., 2000)
Cytokines caractéristiques de la réponse Th1	IL-2	(Buxton et al., 2007; Buxton et al., 1994)	(Oviedo-Boyso et al., 2007)
	INF $\gamma$	(Buxton et al., 2007; Innes, 1997; Innes et al., 2007; Innes et al., 1995b)	(Fournier and Philpott, 2005; Oviedo-Boyso et al., 2007; Sasaki et al., 2000)
Cytokines caractéristiques de la réponse Th2	IL-4		(Sasaki et al., 2000)
	IL-6		(Fournier and Philpott, 2005; Oviedo-Boyso et al., 2007; Sasaki et al., 2000)
	IL-10		(Fournier and Philpott, 2005; Sasaki et al., 2000)
Enzymes intracytoplasmiques	iNOS	(Suzuki, 2002; Yap et al., 2006)	(Sasaki et al., 1998)

Le **tableau 1** illustre le fait que de nombreux effecteurs de la réponse immunitaire sont utilisés à la fois au cours d'une infection par *Toxoplasma gondii* et de celle liée à *Staphylococcus aureus*. Cependant, une des différences majeures est la possible présence d'IL-17 lors de la réponse immunitaire contre *S. aureus*. IL-17 est une cytokine médiatrice de l'inflammation tissulaire. Elle participe au recrutement des neutrophiles. Cette interleukine est synthétisée par les lymphocytes T CD4+ activés par un polysaccharide capsulaire zwitterionique (Zps). Zps est présent chez des bactéries responsables d'abcès tel que *Staphylococcus aureus*, mais aussi *Bacteroides fragiles* ou *Streptococcus pneumoniae*. Zps est capable de stimuler les lymphocytes T CD4+ de l'homme et du rat *in vitro*. Ces lymphocytes T CD4+ activés induisent ensuite la formation d'abcès lorsqu'on les transfère dans la cavité péritonéale de rats naïfs (Chung et al., 2003). Les lymphocytes T CD4+ modulent donc le développement de certaines infections, à *S. aureus* notamment, en contrôlant, par le biais d'IL-17, la migration des neutrophiles (McLoughlin et al., 2006). Zps stimule aussi la production d'IL-8, une autre cytokine qui permet le recrutement des neutrophiles, de TNF $\alpha$  et d'IL-1 (Fournier and Philpott, 2005; Tzianabos and Kasper, 2002).

Notons aussi que les cytokines caractéristiques d'une réponse de type Th2, à savoir IL-4, IL-6 et IL-10 sont présentes lors de la réponse immunitaire contre *S. aureus*. Effectivement, les lymphocytes T CD4+, comme nous l'avons vu, et l'IFN $\gamma$  semblent parfois jouer un rôle aux dépens de l'hôte lors d'infection par *S. aureus*. A l'inverse, IL-10 est importante pour la résistance de l'hôte lors de chocs septiques ou de chocs dus aux toxines staphylococciques. IL-4 et IL-10 semblent jouer un rôle protecteur, grâce à la régulation des IFN $\gamma$  dans les infections à *S. aureus* (Sasaki et al., 2000).



## **B. DEUXIEME PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE**

L'objectif de notre étude est, dans un premier temps, d'évaluer l'effet de la sélection sur la résistance aux mammites, sur la réponse immunitaire à d'autres maladies, en l'occurrence la toxoplasmose. Nous avons vu que les deux lignées de brebis « CCS faibles » et « CCS élevés » n'ont pas la même sensibilité aux infections intra-mammaires. Cependant, il a été montré précédemment que la résistance au parasite *Haemonchus contortus* n'a pas été affectée par la sélection. Nous souhaitons désormais savoir si la réponse des brebis à l'infection par l'agent de la toxoplasmose a été modifiée ou non par cette sélection.

Comme évoqué précédemment, la toxoplasmose est essentielle à étudier, d'une part parce qu'il s'agit d'une zoonose majeure, d'autre part parce qu'elle a une importance économique significative en élevage ovin. De plus, comme nous l'avons vu précédemment, il existe une grande similitude entre les effecteurs de la réponse immunitaire à *Toxoplasma gondii* et les effecteurs de la réponse aux principaux agents bactériens responsables de mammites chez la brebis : les staphylocoques.

Nous allons donc étudier les réponses des brebis des deux lignées après une injection de tachyzoïtes vivants de la souche S48, afin de voir si les modalités de la réponse humorale diffèrent d'une lignée de brebis à l'autre.

En outre, le second intérêt de notre étude est d'affiner les connaissances sur les modalités de la réponse humorale, en étudiant plus précisément la cinétique de production et de persistance des anticorps, à la suite de l'administration du vaccin Ovilis-Toxovax® (Intervet).

### **I. Matériel et méthodes**

#### **I.1. Animaux**

Notre étude porte sur la totalité des agnelles de race Lacaune du millésime 2007 de la sélection divergente sur les CCS réalisée à la ferme expérimentale de La Fage. Une partie de ces agnelles appartient à la première génération de sélection (cf. supra I.2.2) ; l'autre partie



appartient à la seconde, puisque nées de brebis de la première génération de divergence. Au total, 131 animaux ont été inclus dans l'étude de la cinétique d'anticorps après administration du vaccin. Le groupe « CCS- », qui correspond aux animaux avec de faibles valeurs de CCS et donc résistants aux mammites, comporte 67 individus. Dans le groupe « CCS+ », à savoir celui dont les CCS sont élevés et qui est sensible aux infections mammaires, on dénombre 64 individus. Les effectifs dans les deux groupes sont donc équilibrés. Afin d'étudier l'effet de la filiation, les 15 pères des agnelles ont été enregistrés : 7 béliers « CCS+ » et 8 « CCS- » (*Tableau 2*). Les béliers ont, pour la plupart, à la fois des filles de la première et de la seconde génération de la sélection divergente.

**Tableau 2.** Filiations et générations des agnelles du millésime 2007

Numéro Père	CCS père	Nombre de filles	Nombre de filles génération 1	Nombre de filles de génération 2
12000066040501	CCS+	1	0	1
12000204031772	CCS-	14	7	7
12000242000743	CCS-	3	0	3
12000255042305	CCS-	10	5	5
12000311030504	CCS-	6	6	0
12000386030501	CCS-	13	5	8
12000424020632	CCS-	9	2	7
12000440990546	CCS-	6	4	2
12000468021241	CCS+	3	0	3
12000478020725	CCS-	6	0	6
12000552010544	CCS+	12	7	5
12000557021341	CCS+	4	4	0
12000565031663	CCS+	14	9	5
81000083020506	CCS+	13	8	5
81000133020503	CCS+	8	3	5
	<b>Somme</b>	<b>122</b>	<b>60</b>	<b>62</b>

La prévalence sérologique de la toxoplasmose est très faible, voire nulle dans cet élevage. En effet, des analyses sérologiques ont été réalisées sur des brebis ayant avorté et qui étaient par conséquent potentiellement infectées. Seules 2 ou 3 brebis ont eu des résultats interprétés comme positifs, mais à des titres généralement très faibles (inférieurs à 50-80% du seuil de positivité). Par ailleurs, une recherche des anticorps anti-*Toxoplasma gondii* a été réalisée un mois avant la vaccination pour toutes les agnelles, afin de vérifier qu'elles étaient naïves avant l'immunisation.

## **I.2. Protocole expérimental**

Les agnelles ont été vaccinées en une seule injection, avec Ovilis-Toxovax® (Intervet), trois mois avant la lutte 2007. Chacune a reçu une dose vaccinale de 2ml, qui correspond à environ  $10^5$  tachyzoïtes vivants de *T. gondii*, souche S48, par voie sous-cutanée.

La réponse anti-toxoplasme a été évaluée grâce à des prélèvements de sang sur tube sec, réalisées à la veine jugulaire à l'aide de tubes Vacutainer® de 5ml. Ces prélèvements sanguins ont été réalisés sur tous les animaux immunisés, à J0, J7, J15, J22, J30, J45, J65, J91 et J365 après administration du vaccin. Les tubes de sang ont ensuite été centrifugés afin d'isoler le sérum, qui a été conservé à -20°C jusqu'au moment de l'analyse.

## **I.3. Dosage des anticorps par ELISA**

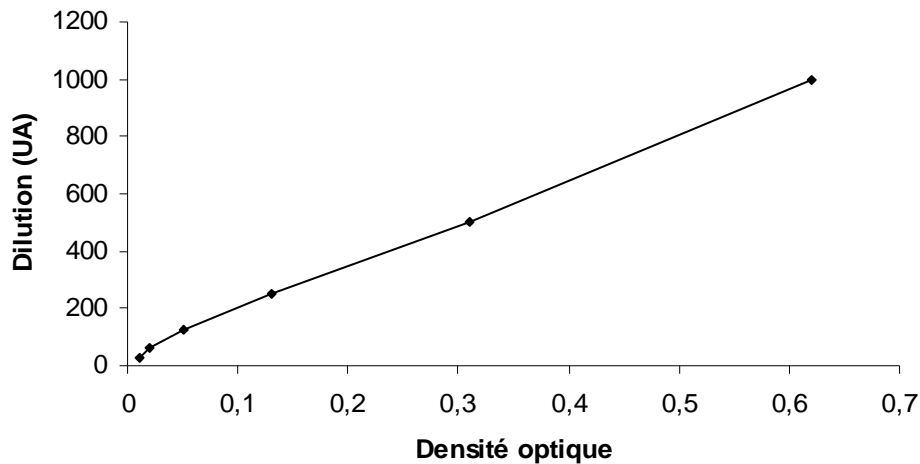
La quantité d'immunoglobulines G spécifiques de *Toxoplasma gondii* sont mesurés à l'aide de la trousse Chekit-Toxotest® (Laboratoires IDDEX), qui est un test immunoenzymatique ou ELISA (*Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*). Les anticorps spécifiques sont recherchés dans le sérum des brebis.

Les cupules de la plaque de microtitration du Chekit-Toxotest® sont sensibilisées avec l'antigène inactivé qui lie spécifiquement les anticorps dirigés contre *T. gondii*. Si l'échantillon contient des anticorps anti- *T. gondii*, ceux-ci se lient à l'antigène inactivé fixé dans les cupules. Les anticorps de l'échantillon sont détectés avec un conjugué Anti-IgG-Ruminant, monoclonal, marqué à la peroxydase, qui oxyde le substrat TMB (3, 3', 5, 5' tétraméthyle benzidine), en produisant une coloration bleue. Lorsque la réaction est stoppée avec la solution d'arrêt ( $H_2SO_4$ ), la couleur du substrat devient jaune. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité d'anticorps spécifiques contenue dans l'échantillon et retenue dans les cupules dans l'intervalle de linéarité de la méthode.

Afin de déterminer le titre en anticorps de chaque échantillon, nous avons établi une courbe de référence avec une solution contenant une concentration connue d'antigène. Pour cela, nous avons utilisé le témoin positif contenu dans la trousse. En outre, un témoin négatif et un « blanc » qui ne contient que la solution tampon ont été inclus dans toutes les plaques analysées. Pour le standard dont le titre en anticorps est connu, nous avons réalisé une série de dilutions au demi pour produire une gamme dont les unités arbitraires sont de 1000, 500, 250, 125, 60 et 30. Cette gamme sert alors de référence pour l'ELISA. Un standard est ainsi établi

par la correspondance entre la densité optique obtenue et chaque point de la gamme de référence. Le titre de chaque échantillon est exprimé en unités arbitraires, grâce aux densités optiques des différentes dilutions. On obtient alors un graphique donnant le titre en fonction de la densité optique : c'est la courbe du standard (*Figure 5*).

**Figure 5.** Exemple de courbe du standard



Les échantillons à tester sont dilués au  $1/400^{\text{ème}}$ , au  $1/2000^{\text{ème}}$  ou au  $1/4000^{\text{ème}}$  et testés avec la technique ELISA décrite précédemment. La densité optique de chaque échantillon est obtenue. Puis, la courbe standard, dans sa partie linéaire, permet d'exprimer chaque mesure de densité optique par une valeur en unités arbitraires ou titre. On corrige le facteur de dilution appliqué à l'échantillon, et on obtient le titre en anticorps défini en unités arbitraires.

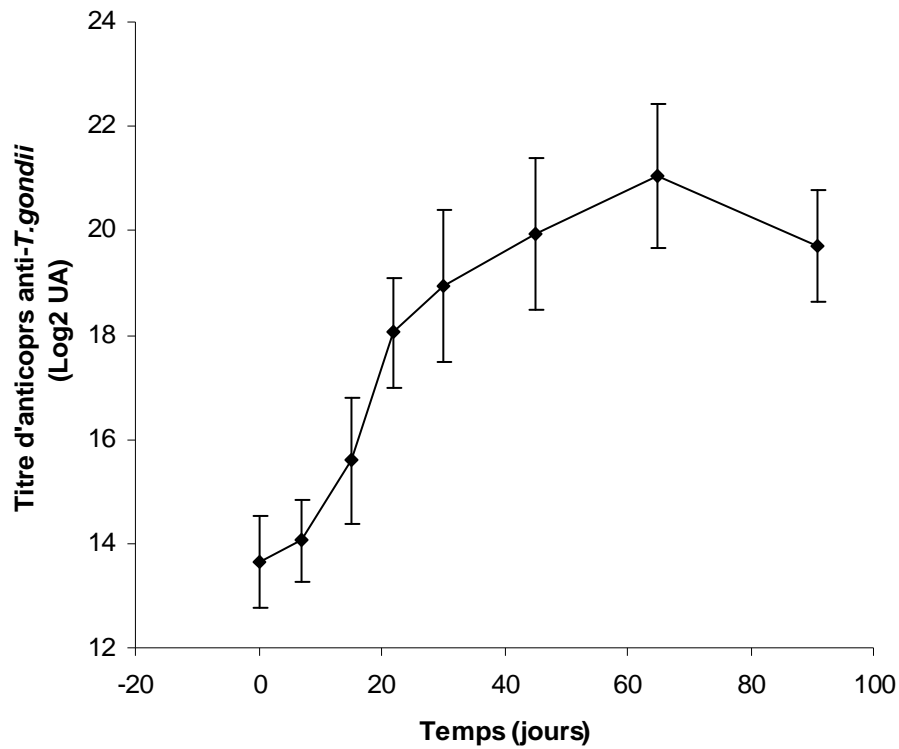
## **II. Résultats**

### **II.1. Cinétique de la réponse anticorps**

Le taux d'immunoglobulines G augmente dans le sang, dès la première semaine qui suit l'injection de  $10^5$  tachyzoïtes S48. L'augmentation de la quantité d'anticorps se poursuit jusqu'à atteindre un pic au  $65^{\text{ème}}$  jour après l'injection vaccinale. Comme l'illustre la *figure 6*, l'augmentation du taux d'IgG se divise en trois phases : une première phase de croissance lente, jusqu'à J7 ; une deuxième phase d'augmentation rapide, de J7 à J22, pendant laquelle le

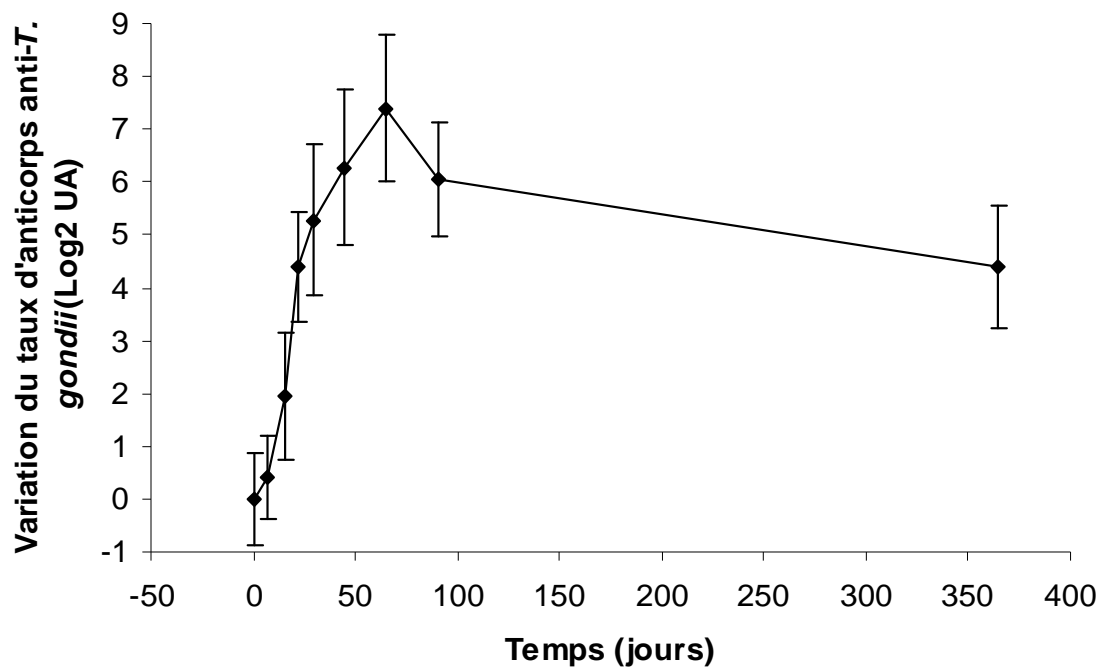
taux d'anticorps anti-*T. gondii* est multiplié par 20 en 15 jours ; enfin, une phase de croissance plus lente, de J22 à J65.

**Figure 6.** Evolution du taux d'anticorps (IgG) anti- *T. gondii* dans les 3 mois suivants l'injection de tachyzoïtes vivants S48



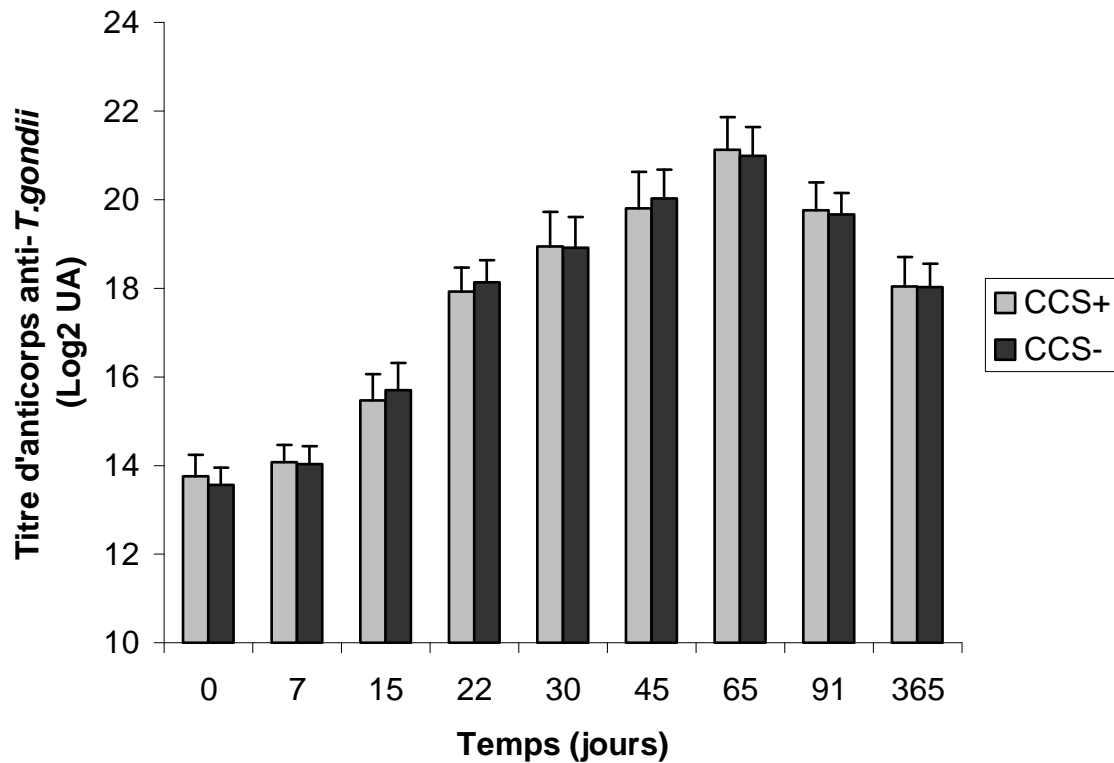
A partir de J65, la quantité d'IgG dans le sang diminue. La diminution est brutale de J65 à J91. Puis, à partir du 3<sup>ème</sup> mois suivant l'injection vaccinale, la diminution du taux d'anticorps anti-*T. gondii* dans le sang est très lente (**Figure 7**). Un an après l'administration du vaccin, la quantité d'IgG est encore 25 fois supérieure au seuil de détection de l'ELISA ou à celle d'un animal sain et non vacciné.

**Figure 7.** Evolution du taux d'anticorps (IgG) anti- *T. gondii* l'année qui suit l'injection de tachyzoïtes vivants S48



## II.2. Comparaison entre les deux lignées

**Figure 8.** Comparaison des titres anticorps des brebis des lignées « CCS+ » et « CCS- » après l'injection du vaccin S48



Comme le montre la **figure 8**, les titres anticorps des brebis des lignées « CCS+ » et « CCS- » sont pratiquement identiques au cours du temps après la vaccination. Lorsqu'on effectue une analyse statistique avec le test de Student afin de comparer les taux d'anticorps des agnelles de la lignée « CCS+ » avec ceux de la lignée « CCS- » à chaque prise de sang, les résultats du test sont compris entre 0,12 et 0,49 (**Tableau 3**). Ces résultats mettent en évidence le fait que le taux d'IgG anti- *T. gondii* produites en réponse à l'injection vaccinale n'est pas significativement différent, d'une lignée de brebis à l'autre, de J0 à J365 suivant l'administration du vaccin. La dynamique de réponse des anticorps suite à la vaccination avec la souche S48 ne diffère pas entre les lignées de la sélection CCS.

**Tableau 3.** Titres en anticorps anti- *T. gondii* moyens et écarts-type dans les deux lignées de brebis et résultats de l'analyse statistique (Test de Student) à chaque date de prélèvement

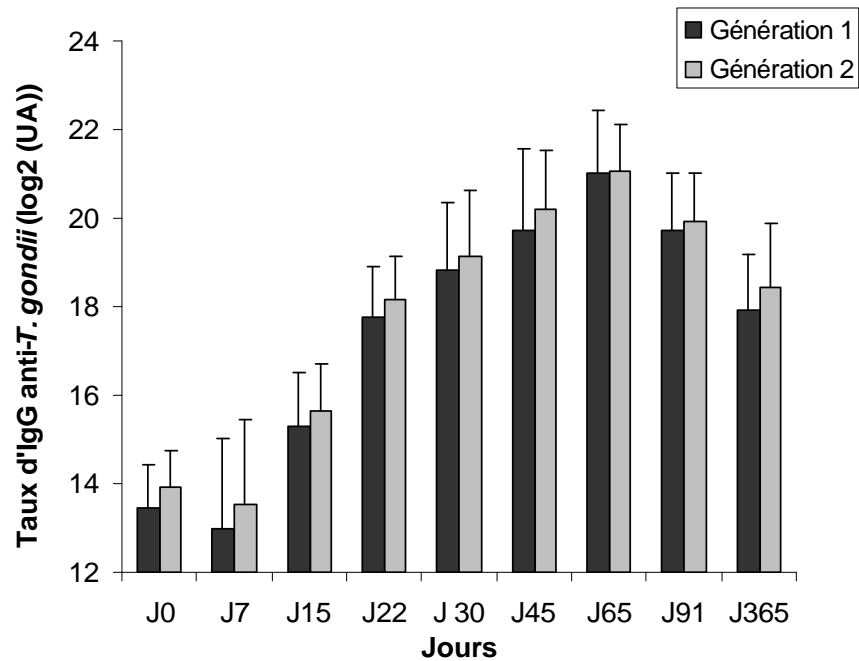
Lignées	Jours	0	7	15	22	30	45	65	91	365
CCS+	MOYENNE (log2 UA)	13,76	14,07	15,47	17,93	18,95	19,81	21,13	19,76	18,04
	ECART-TYPE	0,96	0,80	1,18	1,08	1,54	1,66	1,49	1,26	1,33
CCS-	MOYENNE (log2 UA)	13,56	14,04	15,69	18,13	18,92	20,03	21,00	19,67	18,04
	ECART-TYPE	0,79	0,79	1,23	1,00	1,36	1,31	1,30	0,96	1,04
STUDENT		0,12	0,40	0,16	0,14	0,46	0,22	0,31	0,35	0,49

### **II.3. Analyse de l'effet « génération » et de l'effet « père »**

#### **II.3.1. Effet « génération »**

Des brebis des générations 1 et 2 de la sélection divergente ont été incluses dans l'étude, que ce soit pour la lignée « CCS+ » comme pour la lignée « CCS - ». Comme l'illustre la **figure 9**, il n'y a pas de différence significative des taux d'anticorps anti-*T. gondii* entre les deux générations de brebis de la lignée « CCS+ » suite à l'injection du vaccin S48. Une analyse de variance effectuée date par date confirme ces résultats ; les valeurs de « p » sont respectivement données dans le **tableau 4** ; elles sont toutes comprises entre 0,15 et 0,85.

**Figure 9.** Comparaison de la réponse anticorps des brebis de génération 1 et 2 de la lignée « CCS+ » après injection du vaccin S48



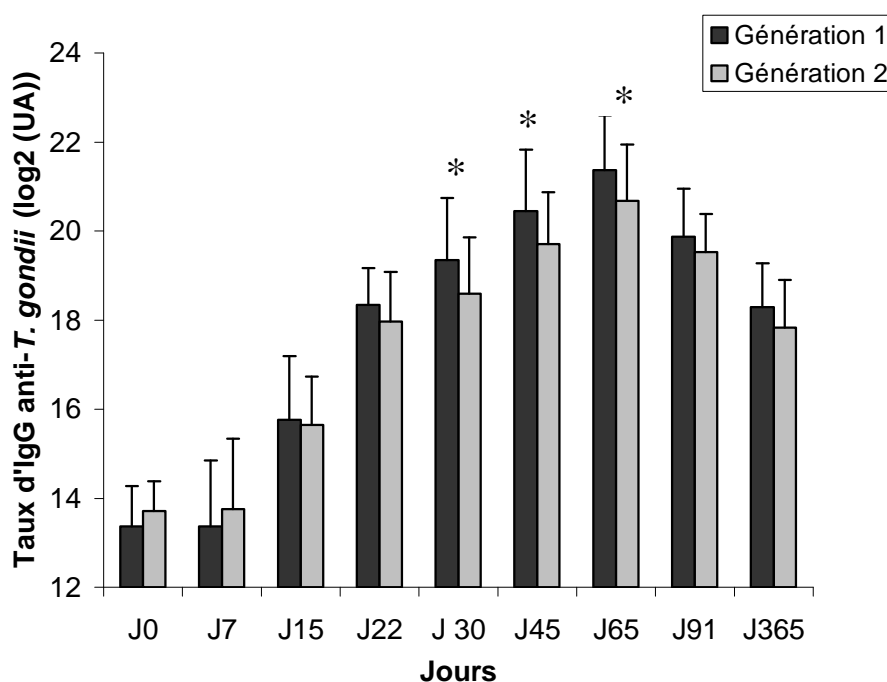
En revanche, pour la lignée « CCS - », il existe une différence faiblement significative de la production d'IgG suite à l'injection vaccinale de Toxovax® entre les deux générations de brebis de J30 à J65, c'est-à-dire au moment où la quantité d'anticorps dans le sang est maximale (*figure 10*). En effet les brebis de la première génération ont des taux d'IgG anti-*T. gondii* significativement supérieurs à ceux des brebis de génération 2 à J30, J45 et J65. Cependant, de J0 à J30 et de J91 à J365, il n'y a pas de différence significative entre les deux générations. L'analyse de variance donne les résultats consignés dans le tableau suivant :



**Tableau 4.** Titres en anticorps anti- *T. gondii* moyens et écarts-type dans les deux générations de chaque lignée de brebis et résultats de l'analyse de variance à chaque date de prélèvement

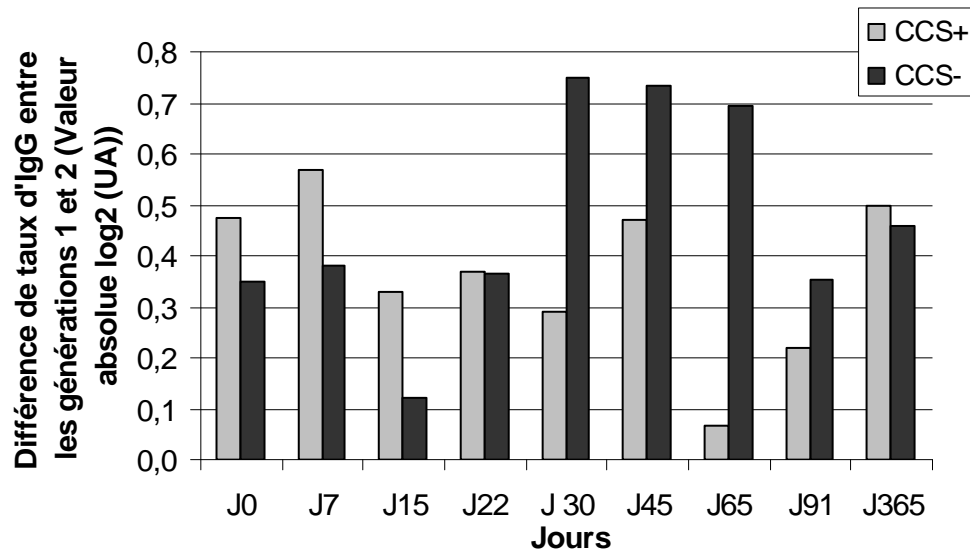
			<b>J0</b>	<b>J7</b>	<b>J15</b>	<b>J22</b>	<b>J 30</b>	<b>J45</b>	<b>J65</b>	<b>J91</b>	<b>J365</b>
<b>CCS+</b>	<b>Génération 1</b>	<b>Moyenne (log2 (UA))</b>	13,461	12,972	15,306	17,784	18,832	19,744	21,008	19,711	17,940
		<b>Ecart-type</b>	0,986	2,053	1,217	1,119	1,506	1,826	1,427	1,312	1,239
	<b>Génération 2</b>	<b>Moyenne (log2 (UA))</b>	13,935	13,542	15,637	18,153	19,122	20,214	21,075	19,929	18,439
		<b>Ecart-type</b>	0,818	1,916	1,061	0,965	1,509	1,313	1,050	1,078	1,426
	<b>analyse de variance</b>	<b>p</b>	<b>0,277</b>	<b>0,343</b>	<b>0,445</b>	<b>0,231</b>	<b>0,397</b>	<b>0,231</b>	<b>0,846</b>	<b>0,462</b>	<b>0,157</b>
<b>CCS-</b>	<b>Génération 1</b>	<b>Moyenne (log2 (UA))</b>	13,363	13,374	15,760	18,338	19,349	20,442	21,369	19,877	18,293
		<b>Ecart-type</b>	0,909	1,473	1,424	0,826	1,388	1,386	1,225	1,067	0,976
	<b>Génération 2</b>	<b>Moyenne (log2 (UA))</b>	13,718	13,754	15,643	17,974	18,598	19,707	20,674	19,525	17,834
		<b>Ecart-type</b>	0,662	1,583	1,083	1,106	1,259	1,163	1,266	0,854	1,067
	<b>analyse de variance</b>	<b>p</b>	<b>0,073</b>	<b>0,376</b>	<b>0,693</b>	<b>0,150</b>	<b>0,035*</b>	<b>0,040 *</b>	<b>0,029 *</b>	<b>0,192</b>	<b>0,128</b>

**Figure 10.** Comparaison de la réponse anticorps des brebis de génération de sélection 1 et 2 de la lignée « CCS- » après injection du vaccin S48



La **figure 11** met en évidence les différences de production d'IgG anti-*T. gondii* entre les animaux de la génération 1 et ceux de la génération 2, et notamment à J30, J45 et J65 après la vaccination pour la lignée « CCS -».

**Figure 11.** Différence de sécrétion d'IgG anti-*T. gondii* entre les deux générations d'animaux



### II.3.2. Effet « père »

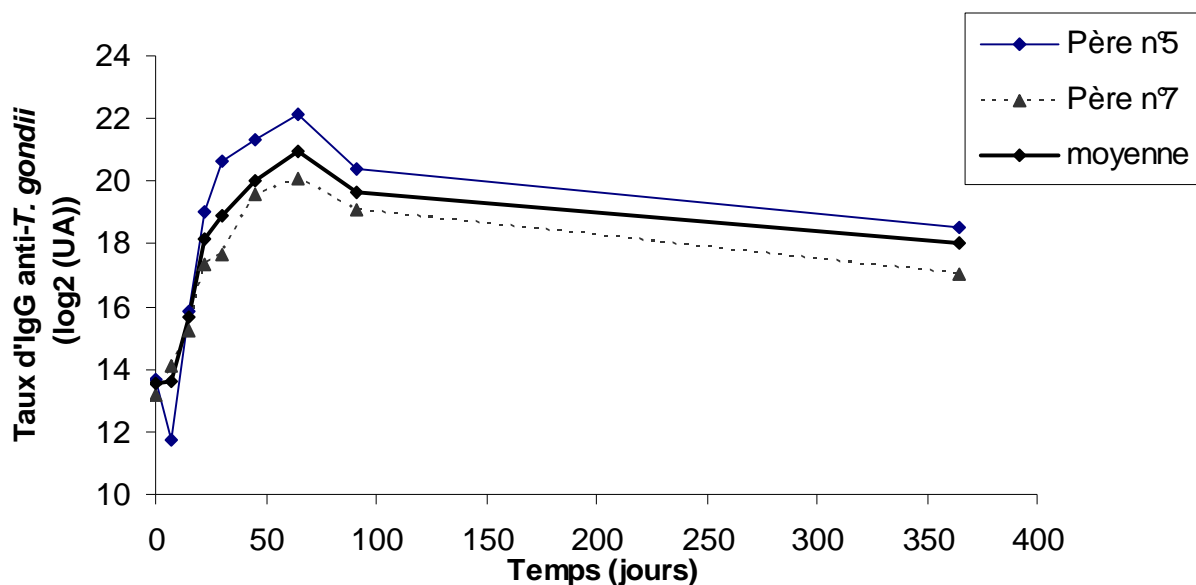
Etant donné que nous avons mis en évidence une différence de réponse entre les deux générations dans la lignée « CCS -», notre première hypothèse a été que cette différence pouvait être due à un ou plusieurs géniteurs. Aussi, nous avons étudié plus précisément l'influence de l'origine paternelle dans cette lignée. Le **Tableau 5** nous montre que les taux moyens d'anticorps des brebis de la lignée « CCS -» sont relativement comparables. Néanmoins, les filles des béliers 5, 6 et 7 se distinguent des autres. En effet, les filles du bélier n°5 ont des taux d'IgG supérieurs à la moyenne alors que les filles des béliers 6 et 7 ont des taux d'IgG inférieurs à la moyenne, notamment de J30 à J65 (**Figure 12**). Une analyse de variance confirme qu'il y a un effet père à J30 ( $p=0,0005^{**}$ ) et le test de Scheffé indique que les pères responsables de cet effet sont les pères 5, 6 et 7 (**Figure 13**).

**Tableau 5.** Taux d'IgG anti-*T. gondii* moyen chez les filles de la lignée « CCS -» de J30 à J370 après l'injection vaccinale

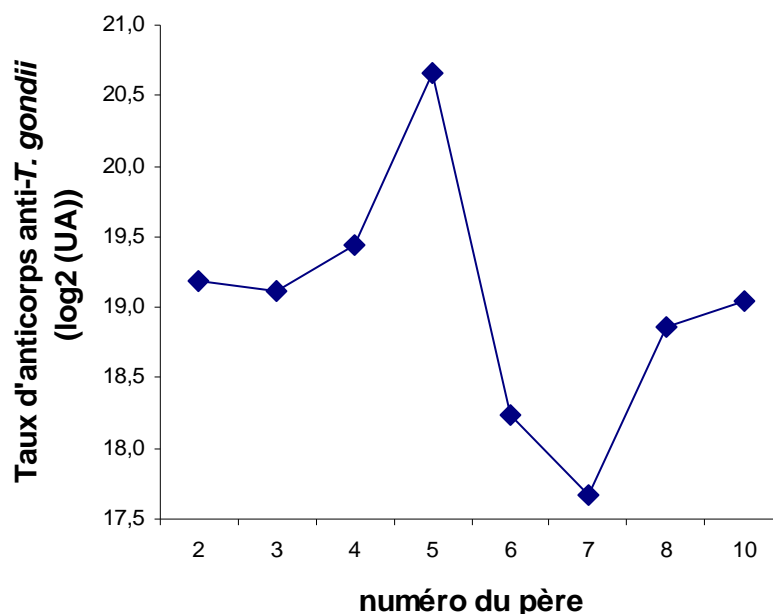
Numéro Père		Moyenne à J30	ET à J30	Moyenne à J45	ET à J45	Moyenne à J65	ET à J65	Moyenne à J91	ET à J91	Moyenne à J370	ET à J370
12000204031772	2	19,19	1,41	20,11	1,49	20,85	1,31	19,90	1,21	18,52	0,72
12000242000743	3	19,12	1,42	20,35	0,45	21,32	0,58	19,61	0,87	18,39	1,94
12000255042305	4	19,44	1,27	19,98	1,28	21,02	1,23	19,99	0,71	17,92	1,13
12000311030504	5	<b>20,66</b>	1,40	<b>21,31</b>	1,01	<b>22,13</b>	0,98	<b>20,40</b>	0,75	<b>18,54</b>	0,90
12000386030501	6	18,24	0,62	19,56	1,27	20,72	1,07	19,47	0,94	18,27	0,93
12000424020632	7	17,67	1,12	19,61	1,37	20,07	0,75	19,11	0,67	17,00	0,80
12000440990546	8	18,86	0,35	20,26	0,95	21,36	1,00	19,29	0,73	17,98	0,77
12000478020725	10	19,05	1,43	19,86	7,50	21,51	8,01	19,65	7,71	17,74	7,21
<b>Moyenne</b>		19,03		20,13		21,12		19,68		18,05	

ET = Ecart-type Moyenne en log<sub>2</sub> (UA)

**Figure 12.** Comparaison des taux d'IgG anti-*T. gondii* des filles des béliers 5 et 7 par rapport à la moyenne des brebis « CCS -»



**Figure 13.** Comparaison des taux d'anticorps moyens des filles des différents béliers à J30



Comme nous l'avons vu précédemment (B-I.1), les béliers ont à la fois des filles de la première génération de sélection, mais aussi de la seconde. Cependant chaque père n'a pas exactement le même nombre de filles dans chaque génération. Par exemple le père n°5, dont les filles ont les taux d'IgG les plus élevés à partir de J30, a 6 filles dans le groupe de première génération et aucune dans le groupe de la seconde ; le père n°7, qui à l'inverse a des filles dont les taux d'IgG sont les plus bas à partir de J30, a davantage de filles de seconde génération (7 contre 2 de la première). Ces différences de la composition des groupes de 1<sup>ère</sup> et 2<sup>ème</sup> génération, associées aux faibles effectifs analysés, sont probablement à l'origine des différences qui ont été constatées sur la production d'anticorps entre les brebis de génération 1 et 2 de la sélection divergente.

Ces différences sont minimes et nous ne pouvons pas conclure de façon certaine à l'existence d'une différence de quantité d'anticorps anti-*T. gondii*, au moment où la quantité est maximale dans le sang, entre les animaux des deux générations.

L'ensemble des données obtenues indique qu'il n'existe probablement pas de différence de la production et de la persistance des anticorps anti-*T. gondii* à la suite de la vaccination avec la souche S48, entre les brebis de la sélection divergente sur les CCS.

### **III. Discussion**

La quantité d'IgG anti-*T. gondii*, de J0 à J365 après l'administration de tachyzoïtes vivants S48, ne diffèrent donc pas d'une lignée de brebis à l'autre. Les modalités de la réponse immunitaire humorale ne sont donc pas affectées par la sélection génétique pour une résistance accrue aux mammites. Or nous savons que les anticorps sont essentiels pour bloquer l'entrée des parasites dans les cellules au cours des infections suivant un premier contact infectieux ou vaccinal. La sécrétion précoce des anticorps a un rôle primordial dans la résistance de l'hôte à la toxoplasmose lors des infections ultérieures (Innes et al., 2007; Innes and Wastling, 1995b; Wastling et al., 1995). La sélection n'a donc probablement pas modifié la capacité de réponse, et la résistance à la toxoplasmose des brebis, dans les conditions que nous avons utilisées, comme l'indiquent l'utilisation de la souche vaccinale S48 et l'évaluation de la réponse anticorps ainsi produite.

#### **III.1. Le vaccin Toxovax induit une production d'anticorps détectable pendant au moins un an**

Après la vaccination des agnelles avec des tachyzoïtes vivants S48, on observe le développement de la réponse immunitaire accompagnée de la production d'anticorps moins d'une semaine après l'injection, puis une augmentation rapide du taux d'IgG anti-*T. gondii*. Le pic d'anticorps est atteint après 2 mois environ. Dans les études précédentes (Buxton et al., 1991; Buxton et al., 1993; Maley et al., 1997), le titre maximal d'anticorps est atteint plus précocement, entre 4 et 6 semaines après l'administration du même vaccin. Ensuite, de 3 mois jusqu'à 1 an après la vaccination, la diminution du taux d'anticorps est très lente. Nos observations confirment les données obtenues dans les études précédentes (Buxton et al., 1991; Buxton et al., 1993). En effet, dans ces deux études, la diminution du titre en IgG est relativement forte entre la 5<sup>ème</sup> et la 24<sup>ème</sup> semaine suivant la vaccination, avec une diminution d'un facteur deux de la valeur de la densité optique. Puis, de 24 à 80 semaines, le taux d'anticorps est stable.

Lors de l'infection de brebis naïves par des pathogènes sauvages, la production d'anticorps ne commence généralement que deux semaines après l'ingestion des ookystes sporulés. Puis, l'augmentation du titre IgG est plus ou moins rapide en fonction des études : le

pic est atteint entre 5 semaines (Buxton et al., 1993) et 7 à 9 semaines après l'infection (Buxton et al., 1991; Buxton et al., 1989). La réponse immunitaire humorale est donc plus longue à apparaître que lors de l'injection de tachyzoïtes vivants. Cependant, dans les trois expériences que nous citons, les brebis étaient gestantes d'environ 90 jours lors de l'infection. Or, il a été montré que les capacités de réponse immunitaire des femelles gestantes sont modifiées.

Par ailleurs, la réponse induite par les souches sauvages semble plus intense que celle induite par les tachyzoïtes S48. En effet, lors de l'ingestion d'ookystes sporulés, le titre en IgG au pic de la production d'anticorps est supérieur d'environ 40% à celui induit par le vaccin (Buxton et al., 1991; Buxton et al., 1993).

Dans notre étude, la lente diminution du taux d'IgG anti-*T. gondii*, après avoir atteint une valeur maximale, suggère qu'après immunisation avec le vaccin Toxovax®, la protection des brebis contre la toxoplasmose est durable. De plus, Buxton (Buxton et al., 1993) montre que, même si les taux d'anticorps circulants sont proches de ceux de brebis naïves plus de 7 mois après l'injection vaccinale, la protection induite par les tachyzoïtes de la souche S48 est toujours présente et efficace. Ainsi, plus de 7 mois après la vaccination, la mesure du titre en anticorps seule ne permet pas de savoir si un animal est protégé ou non contre la toxoplasmose. Ceci est lié au rôle essentiel de la réponse à médiation cellulaire en particulier durant la phase mémoire de la réponse immunitaire. Une évaluation de l'efficacité de la réponse cellulaire spécifique au parasite *T. gondii*, un an après l'injection vaccinale nous permettrait de connaître plus précisément la durée de la protection conférée par les tachyzoïtes de la souche S48.

### **III.2. La sélection pour une résistance accrue aux mammites ne modifient pas la réponse anticorps vis-à-vis de *T. gondii***

La production d'anticorps équivalente dans les deux lignées de brebis suggère, qu'après l'administration du vaccin Ovilis-Toxovax® (Intervet), une réplication des tachyzoïtes a eu lieu et a été suffisamment intense pour induire une réponse immunitaire humorale. En effet, chez les animaux résistants à la toxoplasmose, comme chez le rat Lewis, l'infection est contrôlée si précocement, notamment par les macrophages, que non seulement

la présence du parasite est indétectable dans l'organisme, mais il n'y a pas non plus de production d'anticorps anti-*T. gondii* (Cavailles et al., 2006; Sergent et al., 2005). Donc, dans notre étude, si la production d'immunoglobulines G est comparable, on peut supposer que les tachyzoïtes produits étaient aussi en nombre assez comparable et suffisant pour induire la réponse anticorps. Le protocole utilisé a été capable d'induire la production d'anticorps, mais aussi très probablement de stimuler la réponse immunitaire cellulaire et ainsi permettre la mise en place d'une réponse immunitaire complète et efficace, que ce soit dans la lignée de brebis résistantes aux mammites, comme dans la lignée sensible.

Cependant, un dénombrement des tachyzoïtes dans le sang par PCR (*Polymerase Chain Reaction*) dans les dix jours suivant la vaccination aurait permis de mieux évaluer si la résistance dite naturelle, c'est-à-dire la capacité de l'hôte à maîtriser la réplication et la dissémination du parasite au début de l'infection, est identique dans les deux lignées.

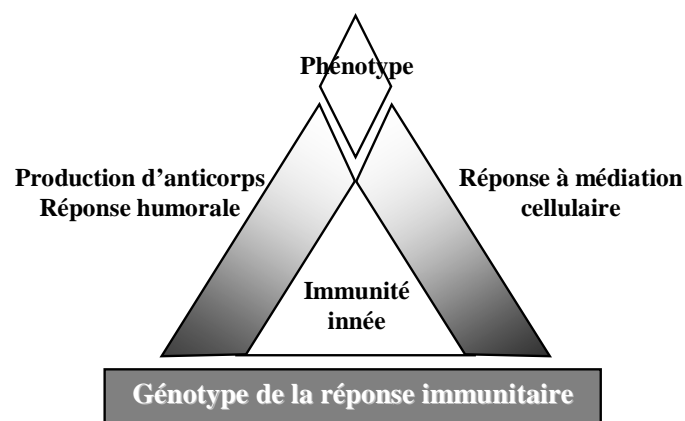
D'autre part, la sélection sur le critère CCS a permis d'obtenir deux lignées de brebis avec des sensibilités aux mammites cliniques et subcliniques, très différentes. Or, les principaux agents responsables d'infections intra-mammaires chez les ovins sont les staphylocoques. Ainsi, les brebis ont donc indirectement été sélectionnées pour leur résistance vis à vis d'un type de pathogène en particulier : les staphylocoques. La lignée « CCS+ » est sensible aux mammites et par conséquent aux staphylocoques tandis que la lignée « CCS- » est résistante. Les deux lignées de brebis n'ont donc pas la même capacité de réponse immunitaire vis-à-vis des staphylocoques. La réponse immunitaire sous le contrôle génétique de l'hôte est différente d'une lignée à l'autre. Néanmoins, les deux lignées de brebis répondent de façon identique à l'agent de la toxoplasmose, dans les conditions que nous avons utilisées, à savoir l'utilisation de la souche vaccinale S48 et au moyen de l'évaluation de la réponse anticorps. On peut donc supposer que les mécanismes communs aux réponses immunitaires contre les staphylocoques et contre *Toxoplasma gondii* ne sont pas affectés par la sélection génétique.

Cependant, une analyse de la réponse cellulaire, et en particulier de la production d'IFN $\gamma$  par les lymphocytes T CD4+, aurait permis, premièrement, de confirmer qu'un des mécanismes de la réponse immunitaire contre le toxoplasme, et qui est en partie commun à la réponse vis-à-vis des staphylocoques, n'est pas différent d'une lignée de brebis à l'autre, et, deuxièmement, d'évaluer l'efficacité du vaccin pour induire la production de ces effecteurs qui participent largement à la protection contre *T. gondii*.

Par ailleurs, lors de la production des ovins de la sélection divergente pour une résistance accrue aux mammites, les animaux ont été sélectionnés en fonction des comptages cellulaires somatiques. Comme le montrent les critères d'évaluation (mammites cliniques, abcès dans le parenchyme mammaire et bactériologies du lait), la sélection est efficace. Elle a donc un caractère relativement spécifique du pathogène en question, c'est-à-dire des staphylocoques.

Cependant, la sélection a porté sur un caractère phénotypique mesurable, les CCS, et non sur un ou plusieurs gènes, ni sur une modalité précise de la réponse immunitaire. Ainsi cette sélection met en jeu de nombreux gènes, comme l'illustre la **figure 14**. Lorsque plusieurs gènes sont impliqués, la probabilité d'altérer une modalité de réponse immunitaire préjudiciable pour l'animal, face à d'autres agents infectieux que celui pour lesquels il a été sélectionné, est probablement moindre. Dans le cadre de notre étude, la sélection pour la résistance aux mammites n'a pas altéré la résistance à *Haemonchus contortus* (Pfeiffer, 2007), ni celle à *Toxoplasma gondii* de la souche S48 comme le suggère l'analyse de la réponse humorale.

**Figure 14.** Les réponses immunitaires innées et acquises face à des infections sont contrôlées de manière complexe et polygénique par des QTLs (Quantitative trait loci) codant à la fois pour des gènes de structures et de régulations (Wilkie and Mallard, 1999)



Les résultats obtenus dans cette étude sont encourageants. Effectivement, les brebis « CCS- », résistantes aux mammites, répondent à un besoin des éleveurs et de la filière laitière ovine. Aussi, l'objectif est d'appliquer cette sélection en élevage. Leur résistance aux mammites a été prouvée (Rupp et al., 2009), et elles ne sont pas pour autant plus sensibles à



d'autres pathogènes d'importance économique majeure en élevage comme par exemple le parasitisme digestif par *Haemonchus contortus* (Pfeiffer, 2007) ou *Toxoplasma gondii*, qui est une cause abortive non négligeable. Ainsi, la sélection pour une meilleure résistance aux mammites chez les ovins semble respecter tout à fait les conditions qui avaient été énoncées par Stear il y a quelques années déjà, à savoir la faisabilité, la durabilité et le caractère souhaitable de cette sélection (Stear et al., 2001).

Par ailleurs, en ce qui concerne les craintes suscitées par la sélection génétique en matière de Santé Publique et de modification de la sensibilité des animaux à cette maladie, la réponse des deux groupes de brebis ayant les mêmes caractéristiques après l'administration du vaccin S48, elles ne sont à l'heure actuelle pas justifiées. Au contraire, sachant que les brebis « CCS- » répondent de façon identique aux brebis « CCS+ » pour la production d'anticorps lors de la vaccination avec des tachyzoïtes S48, l'efficacité du vaccin Toxovax® (Intervet) n'est pas modifiée par la sélection ; il permet en outre de protéger ces animaux contre la toxoplasmose.

Le risque de contamination pour l'homme par les brebis de la lignée résistante, qui est celle que l'on rencontrera le plus fréquemment en élevage dans les prochaines années, n'est pas plus élevé. Les brebis « CCS- » ne seront alors certainement pas responsables d'une recrudescence de la toxoplasmose et elles ne présentent pas de danger supplémentaire pour la santé humaine, leur capacité de réponse n'étant pas altérée, ni augmentée d'ailleurs.

### **III.3. Evaluation du contrôle génétique de la réponse à la vaccination contre la toxoplasmose**

Des agnelles de deux générations de divergence ont été utilisées pour notre étude. En général, lors de sélection divergente, il y a généralement un gain génétique et un accroissement de l'effet sur les caractères sélectionnés durant 3 générations environ. Cependant, pour la sélection pour une résistance accrue aux mammites, aucune différence phénotypique entre la première et la deuxième génération de divergence n'a été observée, pour les caractères relatifs aux mammites qui ont été évalués, à savoir la présence ou non de mammites cliniques et d'abcès dans le parenchyme mammaire, les CCS et les bactériologies du lait. Il n'y a donc pas d'amélioration de la résistance aux mammites de la première à la

deuxième génération de divergence, ceci en relation avec une différence très élevée qui a été produite dès la première génération grâce au choix judicieux des géniteurs. Par conséquent il n'y a probablement pas d'amélioration de la réponse immunitaire contre les staphylocoques. Les deux générations issues de la sélection ont une résistance/sensibilité contre les staphylocoques assez semblable.

L'analyse statistique des données a cependant mis en évidence un effet lié à la génération sur les taux d'IgG anti-*T. gondii* chez les brebis de la lignée « CCS- », quoique de manière ponctuelle. En effet, les brebis de la génération 1 ont des titres en anticorps plus élevés que celles de la génération 2, de J30 à J65 après l'administration du vaccin S48, c'est-à-dire au moment où la concentration sanguine en anticorps est maximale. Aucun effet dû à la génération n'est mis en évidence chez les brebis de la lignée « CCS+ ». L'effet génération observé dans la lignée « CCS- » semble lié en partie à un effet père. Effectivement, les accouplements ont été réalisés de façon à ce que chaque père ait des filles dans chaque génération. Cependant, en raison des aléas à chaque stade de la création de ces animaux, le nombre de filles dans chaque génération n'est pas équilibré. Or un des béliers dont les filles ont les taux d'anticorps les plus élevés, notamment à partir de J30, n'a que des filles de première génération. Inversement, les béliers dont les filles ont les plus faibles taux en anticorps de J30 à J65, ont plus de filles dans la seconde génération. Ces déséquilibres sont probablement à l'origine des différences entre les générations de brebis « CCS- ».

Certains béliers ont donc une descendance chez qui la production d'anticorps est plus élevée que chez d'autres lors de la vaccination. Inversement, d'autres ont une réponse plus faible. Ces résultats mettent en évidence une variabilité individuelle de la réponse à la toxoplasmose, mais aussi une certaine héritabilité de la réponse humorale vis à vis, du toxoplasme.

Il est habituellement admis que la sensibilité ou la résistance aux agents infectieux résulte d'interactions entre différents gènes et l'environnement. Le contrôle de l'infection est donc par essence multigénique. Cependant, dans certains cas, l'issue d'une infection peut être sous le contrôle d'un faible nombre de gènes voire d'un seul gène. C'est le cas de l'infection toxoplasmique chez le rat, dont l'issue est contrôlée par un locus unique, *Toxo 1*, selon un mode mendélien (Cavaillès et al., 2006; Sergent et al., 2005). Le (ou les) gène(s) impliqué(s), qui est (sont) responsable (s) d'une résistance complète à l'infection toxoplasmique et en conséquence de l'absence de production d'anticorps, n'ont pas encore été identifié(s). Nous

n'avons pas observé de situation comparable chez les ovins parmi les 131 brebis, nées de 15 béliers différents, chez qui la réponse vaccinale a été détectée. La connaissance du gène majeur chez le rat pourra ultérieurement permettre son identification et sa localisation dans l'espèce ovine. Nous avons constaté la présence d'une certaine variabilité de la réponse anticorps, qui reste cependant faible. L'identification des gènes impliqués dans la résistance à la toxoplasmose chez d'autres espèces que le rat, et notamment chez les ovins pourrait permettre de faire progresser la connaissance de la physiopathologie de la maladie en général. La sélection d'ovins résistants à la toxoplasmose pourrait même être envisagée, si la variabilité de la réponse est suffisamment grande et si cette sélection était rentable sur le plan économique.

## CONCLUSION

La cinétique de la production d'anticorps en réponse à l'injection de tachyzoïtes vivants de la souche S48, a permis de mettre en évidence le fait qu'après avoir atteint une valeur maximale 60 jours après la vaccination, la diminution du taux d'IgG anti-*T. gondii* est très lente. Les anticorps sont toujours détectables un an après la vaccination. Ainsi, le vaccin Toxovax® (Intervet) confère une immunité durable aux brebis.

La comparaison des deux lignées de brebis souligne le fait que les animaux de la lignée « CCS- » ont les mêmes titres et la même cinétique de production d'immunoglobulines G anti-*T. gondii* que les brebis « CCS+ » après l'administration de tachyzoïtes vivants S48. Ces deux lignées de brebis, qui ont une différence de résistance très significative face aux infections par les staphylocoques, ont une réponse très similaire vis-à-vis de *Toxoplasma gondii* (souche S48), en ce qui concerne la réponse humorale. Cette sélection, qui a porté sur la capacité de réponse générale vis-à-vis de bactéries grâce à des critères phénotypiques, et non pas grâce à la connaissance d'un gène ou d'une modalité particulière de la réponse immunitaire, n'a pas altéré les capacités de réponse de ces animaux contre deux parasites très différents : *Haemonchus contortus*, associé essentiellement à une réponse Th2, et *Toxoplasma gondii*, qui induit préférentiellement une réponse de type Th1 où la production d'IFN $\gamma$  est protectrice.

Notre étude suggère qu'il existe une variabilité génétique de la réponse humorale après vaccination à l'aide de tachyzoïtes vivants S48 chez les ovins. Avec l'identification récente du locus *Toxo 1* chez le rat qui contrôle l'issue de l'infection toxoplasmique selon un mode mendélien, il est possible que la réponse immunitaire vis-à-vis de la toxoplasmose fasse l'objet d'études complémentaires dans l'espèce ovine, afin d'augmenter la résistance globale de cette espèce vis-à-vis d'un agent abortif majeur.

**AGREMENT ADMINISTRATIF**

Je soussigné, A. MILON, Directeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, certifie que  
**Mlle SUTAINÉ, Vanessa, Lydie**  
a été admis(e) sur concours en : 2003  
a obtenu son certificat de fin de scolarité le : 11 juillet 2008  
n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.

**AGREMENT SCIENTIFIQUE**

Je soussigné, Gilles FOUCRAS, Maître de Conférences de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,  
autorise la soutenance de la thèse de :  
**Mlle SUTAINÉ, Vanessa, Lydie**

intitulée :

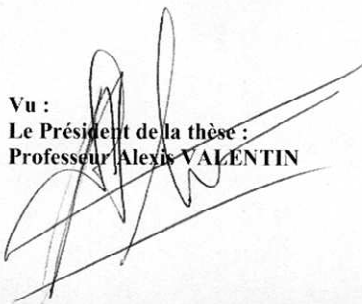
« Etude de la réponse immunitaire contre *Toxoplasma gondii* dans le cadre d'une sélection divergente sur la résistance aux infections mammaires. »



Le Professeur  
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse  
Docteur Gilles FOUCRAS



Vu :  
Le Directeur  
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse  
Professeur Alain MILON



Vu :  
Le Président de la thèse :  
Professeur Alexis VALENTIN

Vu le : 15 décembre 2008  
Le Président  
de l'Université Paul Sabatier  
Professeur Gilles FOURTANIER



UNIVERSITÉ  
DE TOULOUSE  
ET DE LA RÉGION

## **BIBLIOGRAPHIE**

- Barillet, F. (2007): Genetic improvement for dairy production in sheep and goats. *Small Ruminant Research* **70**, 60-75.
- Barillet, F., Rupp, R., Mignon-Grasteau, S., Astruc, J. M., and Jacquin, M. (2001): Genetic analysis for mastitis resistance and milk somatic cell score in French Lacaune dairy sheep. *Genet Sel Evol* **33**, 397-415.
- Bergonier, D., and Berthelot, X. (2003): New advances in epizootiology and control of ewe mastitis. *Livestock Production Science* **79**, 1-16.
- Bergonier, D., de Cremoux, R., Rupp, R., Lagriffoul, G., and Berthelot, X. (2003): Mastitis of dairy small ruminants. *Vet Res* **34**, 689-716.
- Bhopale, G. M. (2003): Development of a vaccine for toxoplasmosis: current status. *Microbes Infect* **5**, 457-62.
- Bishop, S. C., and Morris, C. A. (2007): Genetics of disease resistance in sheep and goats. *Small Ruminant Research* **70**, 48-59.
- Blewett, D. A., Bryson, C. E., and Miller, J. K. (1983): Studies of antibody titres in experimentally induced ovine toxoplasmosis. *Res Vet Sci* **34**, 163-6.
- Bubeck Wardenburg, J., Williams, W. A., and Missiakas, D. (2006): Host defenses against *Staphylococcus aureus* infection require recognition of bacterial lipoproteins. *PNAS* **103**, 13831-13836.
- Buxton, D. (1993): Toxoplasmosis: the first commercial vaccine. *Parasitol Today* **9**, 335-7.
- Buxton, D. (1998): Protozoan infections (*Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Sarcocystis* spp.) in sheep and goats: recent advances. *Vet Res* **29**, 289-310.
- Buxton, D., and Innes, E. A. (1995): A commercial vaccine for ovine toxoplasmosis. *Parasitology* **110 Suppl**, S11-6.
- Buxton, D., Maley, S. W., Wright, S. E., Rodger, S., Bartley, P., and Innes, E. A. (2007): *Toxoplasma gondii* and ovine toxoplasmosis: New aspects of an old story. *Vet Parasitol.*
- Buxton, D., Thomson, K., Maley, S., Wright, S., and Bos, H. J. (1991): Vaccination of sheep with a live incomplete strain (S48) of *Toxoplasma gondii* and their immunity to challenge when pregnant. *Vet Rec* **129**, 89-93.
- Buxton, D., Thomson, K. M., Maley, S., Wastling, J. M., Innes, E. A., Panton, W. R., and Nicoll, S. (1994): Primary and secondary responses of the ovine lymph node to *Toxoplasma gondii*: cell output in efferent lymph and parasite detection. *J Comp Pathol* **111**, 231-41.

- Buxton, D., Thomson, K. M., Maley, S., Wright, S., and Bos, H. J. (1993): Experimental challenge of sheep 18 months after vaccination with a live (S48) *Toxoplasma gondii* vaccine. *Vet Rec* **133**, 310-2.
- Buxton, D., Ugglá, A., Lovgren, K., Thomson, K., Lunden, A., Morein, B., and Blewett, D. A. (1989): Trial of a novel experimental *Toxoplasma iscom* vaccine in pregnant sheep. *Br Vet J* **145**, 451-7.
- Cavaillès, P., Sergent, V., Bisanz, C., Papapietro, O., Colacios, C., Mas, M., Subra, J. F., Lagrange, D., Calise, M., Appolinaire, S., Faraut, T., Druet, P., Saoudi, A., Bessières, M. H., Pipy, B., Cesbron-Delauw, M. F., and Fournie, G. J. (2006): The rat *Tox1* locus directs toxoplasmosis outcome and controls parasite proliferation and spreading by macrophage-dependent mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 744-9.
- Chung, D. R., Kasper, D. L., Panzo, R. J., Chitnis, T., Grusby, M. J., Sayegh, M. H., and Tzianabos, A. O. (2003): CD4+ T cells mediate abscess formation in intra-abdominal sepsis by an IL-17-dependent mechanism. *J Immunol* **170**, 1958-63.
- Contreras, A., Sierra, D., Sanchez, A., Corrales, J. C., Marco, J. C., Paape, M. J., and Gonzalo, C. (2007): Mastitis in small ruminants. *Small Ruminant Research* **68**, 145-153.
- Dekkers, J. C. M., Mallard, B. A., and Leslie, K. E. (1994): Workshop: Genetic improvement of resistance to mastitis of dairy cattle with special emphasis on somatic cell count. *J Dairy Sci* **77**, 616-618.
- Dodds, K. G., McEwan, J. C., and Davis, G. H. (2007): Integration of molecular and quantitative information in sheep and goat industry breeding programmes. *Small Ruminant Research* **70**, 32-41.
- Dubey, J. P. (1994): Toxoplasmosis. *J Am Vet Med Assoc* **205**, 1593-8.
- Esteban-Redondo, I., and Innes, E. A. (1997): *Toxoplasma gondii* infection in sheep and cattle. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* **20**, 191-6.
- Fournier, B., and Philpott, D. J. (2005): Recognition of *Staphylococcus aureus* by the innate immune system. *Clin Microbiol Rev* **18**, 521-40.
- Haenlein, G. F. W. (2007): About the evolution of goat and sheep milk production. *Small Ruminant Research* **68**, 3-6.
- Handman, E., and Remington, J. S. (1980): Antibody responses to toxoplasma antigens in mice infected with strains of different virulence. *Infect Immun* **29**, 215-20.
- Innes, E., and Wastling, J. M. (1995a): Analysis of *in vivo* Immune Responses during *Toxoplasma gondii* Infection using the Technique of Lymphatic Cannulation. *Parasitol Today* **11**.
- Innes, E. A. (1997): Toxoplasmosis: comparative species susceptibility and host immune response. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* **20**, 131-8.

- Innes, E. A., Bartley, P. M., Maley, S. W., Wright, S. E., and Buxton, D. (2007): Comparative host-parasite relationships in ovine toxoplasmosis and bovine neosporosis and strategies for vaccination. *Vaccine* **25**, 5495-503.
- Innes, E. A., Panton, W. R., Sanderson, A., Thomson, K. M., Wastling, J. M., Maley, S., and Buxton, D. (1995a): Induction of CD4+ and CD8+ T cell responses in efferent lymph responding to *Toxoplasma gondii* infection: analysis of phenotype and function. *Parasite Immunol* **17**, 151-60.
- Innes, E. A., Panton, W. R., Thomson, K. M., Maley, S., and Buxton, D. (1995b): Kinetics of interferon gamma production in vivo during infection with the S48 vaccine strain of *Toxoplasma gondii*. *J Comp Pathol* **113**, 89-94.
- Innes, E. A., and Wastling, J. M. (1995b): Analysis of *in vivo* Immune Responses during *Toxoplasma gondii* Infection using the technique of Lymphatic Cannulation. *Parasitol Today* **11**, 268-271.
- Kasper, L. H., and Khan, I. A. (1993): Role of P30 in host immunity and pathogenesis of *T. gondii* infection. *Res Immunol* **144**, 45-8.
- Kielian, T., Esen, N., and Bearden, D. (2005a): Toll-like Receptor 2 (TLR2) Is Pivotal for Recognition of *S. aureus* Peptidoglycan But Not Intact Bacteria by Microglia. *Glia* **49**, 567-576.
- Kielian, T., Haney, A., Mayes, P. M., Garg, S., and Esen, N. (2005b): Toll-like receptor 2 modulates the proinflammatory milieu in *Staphylococcus aureus*-induced brain abscess. *Infect Immun* **73**, 7428-35.
- Kielian, T., Phulwani, N. K., Esen, N., Syed, M. M., Haney, A. C., McCastlain, K., and Johnson, J. (2007): MyD88-dependent signals are essential for the host immune response in experimental brain abscess. *J Immunol* **178**, 4528-37.
- Kim, L., Butcher, B. A., Lee, C. W., Uematsu, S., Akira, S., and Denkers, E. Y. (2006): *Toxoplasma gondii* genotype determines MyD88-dependent signaling in infected macrophages. *J Immunol* **177**, 2584-91.
- Lahouassa, H., Moussay, E., Rainard, P., and Riollet, C. (2007): Differential cytokine and chemokine responses of bovine mammary epithelial cells to *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Cytokine* **38**, 12-21.
- Maley, S. W., Thomson, K. M., Bos, H. J., and Buxton, D. (1997): Serological diagnosis of toxoplasmosis in sheep following vaccination and challenge. *Vet Rec* **140**, 558-9.
- Mavrogenis, A. P., Koumas, A., Kakoyiannis, C. K., and Taliotis, C. H. (1995): Use of somatic cell counts for the detection of subclinical mastitis in sheep. *Small Rum. Res.* **17**, 79-84.
- McLoughlin, R. M., Solinga, R. M., Rich, J., Zaleski, K. J., Cocchiario, J. L., Risley, A., Tzianabos, A. O., and Lee, C. W. (2006): CD4+ T cells and CXC chemokines modulate the pathogenesis of *Staphylococcus aureus* wound infections. *PNAS* **103**, 10408-10413.



- Miller, L. S., O'Connell, R. M., Gutierrez, M. A., Pietras, E. M., Shahangian, A., Gross, C. E., Thirumala, A., Cheung, A. L., Cheng, G., and Modlin, R. L. (2006): MyD88 mediates neutrophil recruitment initiated by IL-1R but not TLR2 activation in immunity against *Staphylococcus aureus*. *Immunity* **24**, 79-91.
- Oviedo-Boyso, J., Valdez-Alarcon, J. J., Cajero-Juarez, M., Ochoa-Zarzosa, A., Lopez-Meza, J. E., Bravo-Patino, A., and Baizabal-Aguirre, V. M. (2007): Innate immune response of bovine mammary gland to pathogenic bacteria responsible for mastitis. *J Infect* **54**, 399-409.
- Owen, M. R., Clarkson, M. J., and Trees, A. J. (1998): Acute phase toxoplasma abortions in sheep. *Vet Rec* **142**, 480-2.
- Parker, S. J., Roberts, C. W., and Alexander, J. (1991): CD8+ T cells are the major lymphocyte subpopulation involved in the protective immune response to *Toxoplasma gondii* in mice. *Clin Exp Immunol* **84**, 207-12.
- Pfeiffer, H. (2007): *Sélection génétique pour une résistance accrue aux mammites : effet sur la réponse à l'infestation par Haemonchus contortus*. Thèse Méd. Vét. Toulouse; 4106; 96pp
- Philipsson, J., Ral, G., and Berglund, B. (1995): Somatic cell count as a selection criterion for mastitis resistance in dairy cattle. *Livestock Production Science* **41**, 195-200.
- Pirisi, A., Lauret, A., and Dubeuf, J. P. (2007): Basic and incentive payments for goat and sheep milk in relation to quality. *Small Ruminant Research* **68**, 167-178.
- Plant, J. W., Richardson, N., and Moyle, G. G. (1974): *Toxoplasma* infection and abortion in sheep associated with feeding of grain contaminated with cat faeces. *Aust Vet J* **50**, 19-21.
- Purner, M. B., Berens, R. L., Nash, P. B., van Linden, A., Ross, E., Kruse, C., Krug, E. C., and Curiel, T. J. (1996): CD4-mediated and CD8-mediated cytotoxic and proliferative immune responses to *Toxoplasma gondii* in seropositive humans. *Infect Immun* **64**, 4330-8.
- Raynal-Ljutovac, K., Pirisi, A., de Crémoux, R., and Gonzalo, C. (2007): Somatic cells of goat and sheep milk: Analytical, sanitary, productive and technological aspects. *Small Ruminant Research* **68**, 126-144.
- Rodger, S., and Buxton, D. (2006): *Toxoplasmosis in Sheep*. *The Moredun Foundation, News Sheet* **4**.
- Rupp, R., Bergonier, D., Dion, S., Hygonenq, M. C., Aurel, M. R., Robert-Granié, C., and Foucras, G. (2009): Response to SCC-based selection for mastitis resistance in a divergent selection experiment in sheep. *J Dairy Sci*.
- Rupp, R., and Boichard, D. (2003): Genetics of resistance to mastitis in dairy cattle. *Vet Res* **34**, 671-88.

- Rupp, R., Lagriffoul, G., Astruc, J. M., and Barillet, F. (2003): Genetic Parameters for Milk Somatic Cell Scores and Relationships with Production Traits in French Lacaune Dairy Sheep. *J Dairy Sci* **86**, 1476-1481.
- Sasaki, S., Miura, T., Nishikawa, S., Yamada, K., Hirasue, M., and Nakane, A. (1998): Protective Role of Nitric Oxide in *Staphylococcus aureus* Infection in Mice. *Infect Immun* **66**, 1017-1022.
- Sasaki, S., Nishikawa, S., Miura, T., Mizuki, M., Yamada, K., Madarame, H., Tagawa, Y. I., Iwakura, Y., and Nakane, A. (2000): Interleukin-4 and interleukin-10 are involved in host resistance to *Staphylococcus aureus* infection through regulation of gamma interferon. *Infect Immun* **68**, 2424-30.
- Sergent, V., Cautain, B., Khalife, J., Deslee, D., Bastien, P., Dao, A., Dubremetz, J. F., Fournie, G. J., Saoudi, A., and Cesbron-Delauw, M. F. (2005): Innate refractoriness of the Lewis rat to toxoplasmosis is a dominant trait that is intrinsic to bone marrow-derived cells. *Infect Immun* **73**, 6990-7.
- Shook, G. E. (1989): Selection for disease resistance. *J Dairy Sci* **72**, 1349-62.
- Shook, G. E., and Schutz, M. M. (1994): Selection on somatic cell score to improve resistance to mastitis in the United States. *J Dairy Sci* **77**, 648-58.
- Stear, M. J., Bishop, S. C., Mallard, B. A., and Raadsma, H. (2001): The sustainability, feasibility and desirability of breeding livestock for disease resistance. *Research in Veterinary Science* **71**, 1-7.
- Strandberg, E., and Shook, G. E. (1989): Genetic and economic Responses to breeding programs that consider mastitis. *J Dairy Sci* **72**, 2136-2142.
- Suzuki, Y. (2002): Host resistance in the brain against *Toxoplasma gondii*. *J Infect Dis* **185 Suppl 1**, S58-65.
- Tenter, A. M., Heckeroth, A. R., and Weiss, L. M. (2000): *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int J Parasitol* **30**, 1217-58.
- Tzianabos, A. O., and Kasper, D. L. (2002): Role of T cells in abscess formation. *Current Opinion in Microbiology* **5**, 92-96.
- Uggla, A., and Buxton, D. (1990): Immune responses against *Toxoplasma* and *Sarcocystis* infections in ruminants: diagnosis and prospects for vaccination. *Rev Sci Tech* **9**, 441-62.
- Wastling, J. M., Harkins, D., Maley, S., Innes, E., Panton, W., Thomson, K., and Buxton, D. (1995): Kinetics of the local and systemic antibody response to primary and secondary infection with S48 *Toxoplasma gondii* in sheep. *J Comp Pathol* **112**, 53-62.
- Weber, J. R., Moreillon, P., and Tuomanen, E. (2003): Innate sensors for Gram-positive bacteria. *Current Opinion in Immunology* **15**, 408-415.
- Wilkie, B., and Mallard, B. (1999): Selection for high immune response: an alternative approach to animal health maintenance? *Vet. Immunol. Immunopathol.* **72**, 231-235.

- Yang, W., Zerbe, H., Petzl, W., Brunner, R. M., Gunther, J., Draing, C., von Aulock, S., Schuberth, H. J., and Seyfert, H. M. (2008): Bovine TLR2 and TLR4 properly transduce signals from *Staphylococcus aureus* and *E. coli*, but *S. aureus* fails to both activate NF-kappaB in mammary epithelial cells and to quickly induce TNFalpha and interleukin-8 (CXCL8) expression in the udder. *Mol Immunol* **45**, 1385-97.
- Yap, G. S., Shaw, M. H., Ling, Y., and Sher, A. (2006): Genetic analysis of host resistance to intracellular pathogens: lessons from studies of *Toxoplasma gondii* infection. *Microbes Infect* **8**, 1174-8.
- Yarovinsky, F. (2008): Toll-like receptors and their role in host resistance to *Toxoplasma gondii*. *Immunolgy Letters* **119**, 17-21.
- Yarovinsky, F., and Sher, A. (2006): Toll-like receptor recognition of *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol* **36**, 255-9.



Toulouse, 2009

NOM : SUTAINÉ

Prénom : Vanessa

TITRE :

ETUDE DE LA REPOSE ANTICORPS CONTRE *Toxoplasma gondii* DANS LE CADRE D'UNE SELECTION DIVERGENTE SUR LA RESISTANCE AUX INFECTIONS MAMMAIRES

RESUME :

Deux lignées de brebis dont la sensibilité aux mammites est très différente, ont été créées par sélection divergente. Notre étude a pour objet de savoir si cette sélection sur le critère des comptages de cellules somatiques (CCS) dans le lait détériore la capacité de réponse immunitaire des animaux face à d'autres pathogènes d'importance majeure en élevage, comme *Toxoplasma gondii*. Pour cela, les deux lignées de brebis ont été vaccinées avec un vaccin vivant atténué de la souche S48 (Ovilis-Toxovax®, Intervet) et la réponse Ig G anti-*T. gondii* a été suivie pendant un an. La production des anticorps induite par le vaccin est détectable pendant au moins un an chez toutes les brebis. La comparaison des titres et de la cinétique des anticorps dans les deux lignées montre que la réponse immunitaire humorale des brebis à la suite de l'administration du vaccin S48 n'a pas été modifiée par la sélection.

MOTS-CLES :

Sélection génétique ; Mammites ; Immunité ; *Toxoplasma gondii* ; Ovins

---

ENGLISH TITLE :

ANTIBODY RESPONSE AGAINST *Toxoplasma gondii* IN A CASE OF DIVERGENT SELECTION TO ENHANCE MASTITIS RESISTANCE

ABSTRACT :

Two lines of ewes which have a really different mastitis susceptibility, were created by divergent selection. The aim of our study is to determine if this selection, based on the milk somatic cell count (SCC) criterion, damages capacity of immune responses against other pathogens that are of major importance in sheep breeding, like *Toxoplasma gondii*. The two lines were vaccinated with a live attenuated S48 strain vaccine (Toxovax® Intervet) and the antibody response associated with anti-*T. gondii* IgG was analysed over one year. Antibody production induced by the vaccine is detectable over at least one year for every ewe. The comparison of antibody titres and kinetics in each line shows that the *Toxoplasma*-specific humoral response was not modified by the genetic selection, when ewes are injected with S48 vaccine.

KEYWORDS :

Genetic selection ; Mastitis ; Immunity ; *Toxoplasma gondii* ; Sheep

