

**UNIVERSITE DE LIMOGES**

**Ecole Doctorale Sciences-Technologie-Santé**

**Faculté de Médecine**

Année : 2005

N°.....

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LIMOGES

Discipline : Biologie Sciences Santé

**Spécialité : Parasitologie**

Présentée et soutenue publiquement par

**Aurélien DUMETRE**

le 04 octobre 2005

à la Faculté de Médecine de Limoges

**Contribution à la détection de *Toxoplasma gondii* dans  
l'environnement et dans des réservoirs animaux**

**Directeur de Thèse : Pr. Marie-Laure DARDÉ**

**JURY**

**Dr. Jean-François DUBREMETZ** (Univ. de Montpellier II)

**RAPPORTEUR**

**Pr. Loïc FAVENNEC** (Univ. de Rouen)

**RAPPORTEUR**

**Pr. Francis DEROUIN** (Univ. de Paris VII)

**EXAMINATEUR**

**Pr. Isabelle VILLENA** (Univ. de Champagne-Ardennes)

**EXAMINATEUR**

**Dr. Philippe THULLIEZ** (Institut de Puériculture de Paris)

**EXAMINATEUR**

**Pr. Marie-Laure DARDE** (Univ. de Limoges)

**DIRECTEUR DE THESE**

*A tous ceux qui ont participé à ce travail et surtout à Zapi*

## Remerciements

J'exprime ma sincère reconnaissance à Madame le Pr. Marie-Laure Dardé qui m'a confié cette thèse, un soir d'octobre 2001, alors que je ne connaissais rien à la parasitologie en général et au toxoplasme en particulier. Votre gentillesse et votre détermination m'ont accompagné tout au long de ce travail. A votre contact, je suis certain d'avoir reçu une des meilleures formations à l'étude de ce parasite fascinant. Je suis redevable de vos efforts administratifs qui ont permis de financer une partie de ma thèse. J'espère, aujourd'hui, me montrer digne de la confiance que vous m'avez accordée.

C'est un grand honneur d'être jugé aujourd'hui par Monsieur le Dr. Jean-François Dubremetz. Vos conseils avisés et les discussions chaleureuses que nous avons pu avoir sur « comment extraire la substantifique moelle d'un oocyste de toxoplasme ? » sont inestimables. Je vous remercie sincèrement pour votre aide en microscopie électronique.

Monsieur le Pr. Loïc Favennec, votre participation en qualité de rapporteur honore cette thèse. Nos préoccupations scientifiques sont similaires et j'espère voir se poursuivre la collaboration initiée entre les laboratoires de Rouen et de Limoges concernant la détection des parasites dans l'eau et chez les mollusques. Je vous remercie sincèrement d'avoir accepté de juger ce travail.

Je remercie infiniment Monsieur le Pr. Francis Derouin d'avoir accepté d'examiner cette thèse. Je connais l'intérêt que vous portez à ce travail et je vous remercie de votre présence. J'ai apprécié votre clairvoyance et votre détermination dans les aventures AFSSA et CRB auxquelles j'ai participé. Vous êtes un modèle pour les jeunes chercheurs qui ont eu la chance de vous rencontrer.

Je remercie chaleureusement Madame le Pr. Isabelle Villena pour sa participation à ce jury. J'espère que vos travaux remarquables menés sur la détection du toxoplasme dans l'environnement trouveront un écho pertinent dans mon travail. A travers vous, je remercie également tout le personnel du laboratoire de Parasitologie de Reims pour les échanges de points de vue et l'aide apportée au moment d'apprendre les techniques de filtration.

Monsieur le Dr. Philippe Thulliez, je suis très honoré de votre participation à ce jury. Elle est le reflet de votre intérêt sans faille pour le toxoplasme et la toxoplasmose. J'admire votre travail et vous remercie pour m'avoir donné votre « recette du MAT ».

Je tiens vivement à remercier le Dr. Bernard Bouteille pour son accueil dans l'EA 3174, sa gentillesse et ses conseils toujours pertinents. Je remercie Messieurs les Pr. Dumas et Preux et l'ensemble du personnel de l'Institut d'Epidémiologie et de Neurologie Tropicale de Limoges. Je remercie Messieurs les Pr. Cogné, Dreyfuss et Guilloton, Madame le Dr. Delage, Monsieur le Dr. Rondelaud, Madame Jayat, pour leurs précieux conseils. Je suis particulièrement reconnaissant envers Madame le Pr. Troutaud et Monsieur le Pr. Deschaux pour m'avoir donné la chance d'enseigner depuis le DEA.

Je tiens vivement à te remercier, Daniel, pour ta bonne humeur (tiens !), ton souci de la problématique (!) et les activités extralabos qui nous réservent toujours de bonnes surprises (grâce à une sorte de *furia francese* qui te caractérise). J'ai trouvé là un grand ami.

Je remercie le personnel du laboratoire de Parasitologie du CHU de Limoges pour leur gentillesse, leur aide et les amitiés nées de ces quelques années passées ensemble. Je suis également redevable des personnes qui ont participé activement à certains aspects de ce travail, notamment pour la capture des animaux.

Je remercie toutes les institutions qui ont contribué à ce travail et particulièrement le Conseil Régional du Limousin pour son soutien matériel.

Je remercie mes amis et collègues de paillasse, particulièrement Bertrand, Caro et l'équipe du 2<sup>ème</sup>, Bienvenue et Homayoun, Daniel de Lavour, Virginie et l'équipe du 4<sup>ème</sup>, sans oublier Dani et son harem.

Je remercie mes amis de toujours, Julien, Seb et Marilyne et aussi Sandra, Rapha, Vivien, et tous les autres.

Pour leur aide sans faille, un grand merci à ma famille qui m'a soutenu, notamment financièrement, et à la famille de Sophie.

Merci à ma déesse de la sagesse, Sophie, qui est incroyable et qui arrivera un jour à réanimer un toxoplasme.

# Table des matières

Liste des figures .....	9
Listes des tableaux.....	10
Liste des annexes .....	12
Liste des abréviations.....	13
<b>INTRODUCTION GENERALE .....</b>	<b>14</b>
<b>PARTIE 1 : L'OOCYSTE DE TOXOPLASME.....</b>	<b>17</b>
<b>1. Cycle évolutif du toxoplasme.....</b>	<b>18</b>
<b>2. Oocystogenèse .....</b>	<b>21</b>
<b>2.1. Stades entéroépithéliaux.....</b>	<b>21</b>
2.1.1. Mérozoïtes.....	21
2.1.2. Microgamétocyte et microgamètes mâles .....	22
2.1.3. Macrogamétocyte et macrogamète femelle.....	22
2.1.4. Fécondation .....	22
2.1.5. Formation de la paroi de l'oocyste.....	23
2.1.6. Émission des oocystes.....	24
<b>2.2. Sporulation.....</b>	<b>25</b>
2.2.1. Paramètres physico-chimiques.....	25
2.2.2. Ultrastructure.....	26
2.2.3. Antigènes.....	28
2.2.4. Autofluorescence.....	29
<b>3. Résistance aux conditions environnementales et aux procédés d'inactivation.....</b>	<b>31</b>
<b>3.1. Facteurs physiques .....</b>	<b>31</b>
3.1.1. Température .....	31
3.1.2. Dessiccation .....	34
3.1.3. Rayonnements .....	34
3.1.4. Hautes pressions.....	34
<b>3.2. Facteurs chimiques.....</b>	<b>35</b>
3.2.1. Acides et bases .....	35
3.2.2. Désinfectants et détergents.....	35

3.2.3. Enzymes .....	36
<b>4. Importance des oocystes dans la transmission de la toxoplasmose .....</b>	<b>37</b>
<b>4.1. Réservoir d'émission .....</b>	<b>37</b>
4.1.1. Chat domestique ( <i>Felis catus</i> ).....	37
4.1.2. Félines sauvages.....	38
<b>4.2. Dissémination et prévalence dans les matrices environnementales.....</b>	<b>39</b>
4.2.1. Sol.....	39
4.2.2. Eau.....	39
4.2.3. Végétaux.....	39
<b>4.3. Exemples d'espèces animales soumises à l'infection par les oocystes .....</b>	<b>40</b>
4.3.1. Rongeurs.....	40
4.3.2. Oiseaux.....	41
4.3.3. Ovins .....	41
4.3.4. Mammifères marins.....	43
<b>4.4. Le rôle des oocystes dans l'infection humaine .....</b>	<b>44</b>
4.4.1. Facteurs de risque associés aux oocystes .....	44
4.4.2. Épidémies et cas groupés de toxoplasmoses par ingestion d'oocystes .....	45
<b>4.5. Association avec des génotypes particuliers.....</b>	<b>47</b>
4.5.1. Diversité génétique du toxoplasme : outils d'analyse et biais de sélection .....	47
4.5.2. Structure génétique de <i>T. gondii</i> .....	47
4.5.3. Quels génotypes circulent dans l'environnement ?.....	49
<b>5. Méthodes de détection des oocystes .....</b>	<b>51</b>
<b>5.1. Stratégies d'échantillonnage.....</b>	<b>51</b>
<b>5.2. Détection dans l'eau .....</b>	<b>52</b>
5.2.1. Concentration .....	52
5.2.2. Purification.....	54
5.2.3. Détection .....	56
<b>5.3. Détection dans les matrices solides .....</b>	<b>58</b>
<b>5.4. Synthèse des méthodes proposées .....</b>	<b>59</b>
<b>6. Conclusion - Objectifs.....</b>	<b>61</b>

<b>PARTIE 2: ÉTUDE EXPERIMENTALE</b> .....	63
<b>1. Parasites utilisés</b> .....	64
<b>1.1. <i>Toxoplasma gondii</i></b> .....	64
1.1.1. Souches.....	64
1.1.2. Contrôle sérologique des animaux infectés.....	64
1.1.3. Production d’oocystes .....	65
<b>1.2. Autres protozoaires</b> .....	70
<b>2. Production et caractérisation de deux anticorps monoclonaux dirigés contre la paroi de l’oocyste de <i>T. gondii</i></b> .....	71
<b>2.1. Production d’anticorps monoclonaux par culture d’hybridomes</b> .....	71
2.1.1. Préparation de l’antigène.....	71
2.1.2. Immunisation.....	73
2.1.3. Fusion et culture d’hybridomes.....	75
<b>2.2. Etudes antigéniques</b> .....	81
2.2.1. Immunofluorescence indirecte .....	81
2.2.2. Immunohistochimie.....	92
2.2.3. Western-blot .....	92
2.2.4. Immunolocalisation par microscopie électronique .....	96
<b>2.3. Discussion - Conclusion</b> .....	101
2.3.1. Réactivité des anticorps produits.....	101
2.3.2. Autofluorescence et antigènes reconnus par les AcM ?.....	103
2.3.3. Conclusion.....	105
<b>3. Développement des méthodes de recherche des oocystes dans l’eau</b> .....	106
<b>3.1. Développement d’une IMS avec l’AcM 3G4</b> .....	106
3.1.1. Billes et aimants .....	106
3.1.2. Suspensions stocks et numération des oocystes.....	107
3.1.3. Méthodes de capture des oocystes .....	107
3.1.4. Résultats .....	110
3.1.5. Discussion .....	114
<b>3.2. Développement d’une IMS avec l’AcM 4B6</b> .....	117
3.2.1. Optimisation de l’IMS-4B6.....	117
3.2.2. Application à la détection dans des eaux expérimentalement contaminées.....	120
3.2.3. Discussion .....	124

<b>3.3. Conclusion</b> .....	125
<b>4. Prévalence du toxoplasme dans l'environnement et dans des réservoirs animaux soumis à une infection par les oocystes</b> .....	126
<b>4.1. Méthodologie</b> .....	126
4.1.1. Dans l'eau.....	126
4.1.2. Dans le sol et les fèces.....	129
4.1.3. Dans les tissus animaux.....	130
4.1.4. Typage génétique des toxoplasmes isolés.....	130
<b>4.2. Prévalence des oocystes dans l'eau, le sol et les fèces</b> .....	133
<b>4.3. Prévalence chez les animaux d'élevage</b> .....	140
4.3.1. Ovins .....	140
4.3.2. Bovins.....	145
4.3.3. Poulets .....	145
<b>4.4. Prévalence chez les animaux sauvages</b> .....	147
4.4.1. Ragondins.....	147
4.4.2. Autres mammifères .....	148
4.4.3. Oiseaux sauvages .....	149
<b>4.5. Discussion – circulation du toxoplasme dans l'environnement</b> .....	151
4.5.1. Dans les matrices environnementales .....	151
4.5.2. Dans les réservoirs animaux domestiques.....	153
4.5.3. Dans les réservoirs animaux sauvages .....	157
4.5.4. Diversité génotypique .....	159
 <b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES</b> .....	 160
 <b>PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS PERSONNELLES</b> .....	 163
 <b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	 166
 <b>ANNEXES</b> .....	 190



# Liste des figures

<b>Figure 1 :</b> Les différents stades évolutifs de <i>Toxoplasma gondii</i> .....	19
<b>Figure 2 :</b> Cycle évolutif de <i>Toxoplasma gondii</i> .....	20
<b>Figure 3 :</b> Formation de la paroi de l’oocyste non sporulé de toxoplasme observée en microscopie électronique.....	24
<b>Figure 4 :</b> Oocyste sporulé de toxoplasme observé en microscopie électronique.....	27
<b>Figure 5 :</b> Autofluorescence des oocystes non sporulés et sporulés de toxoplasme. ....	30
<b>Figure 6 :</b> Méthodes de détection des oocystes dans les matrices environnementales. ....	60
<b>Figure 7 :</b> Objectifs de l’étude et méthodologie appliquée .....	62
<b>Figure 8 :</b> Purification d’oocystes sur gradient discontinu de chlorure de césium. ....	69
<b>Figure 9 :</b> Clonage d’hybridome par la méthode de dilution limite.....	79
<b>Figure 10 :</b> Réactivité en IFI des AcM 3G4 et 4B6 avec les oocystes de toxoplasme.....	82
<b>Figure 11 :</b> Réactivité en IFI des AcM 3G4 et 4B6 avec les tachyzoïtes du toxoplasme. ....	86
<b>Figure 12 :</b> Réactivité en IFI des AcM 3G4 et 4B6 avec les formes de résistance de plusieurs protozoaires.....	89
<b>Figure 13 :</b> Réactivité en IFI des AcM 3G4 et 4B6 avec les oocystes d’ <i>E. maxima</i> et d’ <i>E. tenella</i> .....	90
<b>Figure 14 :</b> Western blots d’oocystes sporulés et non sporulés de toxoplasme.....	95
<b>Figure 15 :</b> Western blots d’oocystes sporulés et non sporulés de toxoplasme.....	95
<b>Figure 16 :</b> Réactivité de l’AcM 3G4 en IME avec l’oocyste non sporulé de toxoplasme.....	98
<b>Figure 17 :</b> Réactivité de l’AcM 3G4 en IME avec l’oocyste sporulé de toxoplasme.....	99
<b>Figure 18 :</b> Réactivité de l’AcM 4B6 en IME avec un sporocyste de toxoplasme. ....	100
<b>Figure 19 :</b> Trois approches pour séparer l’oocyste de toxoplasme par IMS.....	108
<b>Figure 20 :</b> Réaction de fixation d’une immunoglobuline sur un groupement époxy .....	108
<b>Figure 21 :</b> Fixation des billes BM0829 sur des oocystes sporulés après IMS avec l’AcM 3G4.....	111
<b>Figure 22 :</b> Fixation des billes BM0829 sur des sporocystes après IMS avec l’AcM 4B6...	119
<b>Figure 23 :</b> Exemple d’électrophorèse sur gel d’agarose après amplification de cinq marqueurs microsatellites par PCR multiplexe.....	132
<b>Figure 24 :</b> Exemple d’électrophorèse des produits de PCR multiplexe d’un génotype II (Me49) sur séquenceur automatique .....	132
<b>Figure 25 :</b> Oocyste de <i>Cryptosporidium</i> sp. et kystes de <i>G. intestinalis</i> .....	211
<b>Figure 26 :</b> Site dans lequel ont été détectés des oocystes de coccidies (PVT n°16 et 23)...	216

# Listes des tableaux

<b>Tableau 1 :</b> Survie des oocystes sporulés de toxoplasme dans l'eau et les matrices solides ...	33
<b>Tableau 2 :</b> Séroprévalence de la toxoplasmose chez le mouton en France. ....	42
<b>Tableau 3 :</b> Épidémies et cas groupés de toxoplasmoses par ingestion d'oocystes .....	46
<b>Tableau 4 :</b> Principales caractéristiques biologiques et épidémiologiques des génotypes de <i>T. gondii</i> .....	48
<b>Tableau 5 :</b> Caractéristiques de l'infection expérimentale de cinq chats par <i>T. gondii</i> . ....	66
<b>Tableau 6 :</b> Pourcentage d'oocystes purifiés sur gradient de chlorure de césium en fonction de leur durée de conservation à +4°C. ....	70
<b>Tableau 7 :</b> Schéma d'immunisation pour obtenir des anticorps monoclonaux contre la paroi de l'oocyste de toxoplasme .....	73
<b>Tableau 8 :</b> Réactivité en IFI des AcM 3G4 et 4B6 selon le génotype, le milieu et la durée de conservation des oocystes de toxoplasme .....	84
<b>Tableau 9 :</b> Réactivité en IFI des AcM 3G4 et 4B6 après inactivation physique ou chimique des oocystes de toxoplasme.....	85
<b>Tableau 10 :</b> Tableau récapitulatif de la réactivité des AcM 3G4 et 4B6 contre les différents stades de <i>T. gondii</i> et différents protozoaires .....	91
<b>Tableau 11 :</b> Rendement des méthodes directe (B) et indirecte (C) d'IMS avec l'AcM 3G4 et 10 <sup>3</sup> oocystes de toxoplasme.....	112
<b>Tableau 12 :</b> Rendement (en %) de la méthode indirecte (C) d'IMS avec l'AcM 3G4 et 10 <sup>3</sup> oocystes de toxoplasme, en fonction de la température et du tampon d'incubation.....	112
<b>Tableau 13 :</b> Rendement (en %) de la méthode indirecte d'IMS avec l'AcM 3G4 et 10 <sup>3</sup> oocystes de toxoplasme, en fonction du temps de conservation initiale des oocystes et de la méthode de dissociation .....	112
<b>Tableau 14 :</b> Rendement de récupération de sporocystes après filtration et IMS-4B6 d'eaux expérimentalement contaminées .....	123
<b>Tableau 15 :</b> Prélèvements d'eaux de surface contaminées avec des éléments parasitaires d'origine coccidienne .....	135
<b>Tableau 16 :</b> Caractéristiques des 50 prélèvements d'eaux réalisés dans différents contextes épidémiologiques .....	139
<b>Tableau 17 :</b> Séroprévalence de la toxoplasmose dans un troupeau ovin sujet à des cas récents d'avortements toxoplasmiques.....	142

<b>Tableau 18</b> : Séroprévalence de la toxoplasmose chez les agneaux et brebis abattus en Haute-Vienne .....	143
<b>Tableau 19</b> : Séroprévalence de la toxoplasmose chez les agneaux et brebis abattus en Haute-Vienne selon leur origine géographique.....	144
<b>Tableau 20</b> : Séroprévalence de la toxoplasmose bovine en Limousin .....	145
<b>Tableau 21</b> : Caractéristiques biologiques et génétiques de la toxoplasmose chez des poulets de plein air en Haute-Vienne.....	146
<b>Tableau 22</b> : Caractéristiques biologiques et génétiques de la toxoplasmose chez des ragondins en Haute-Vienne.....	148
<b>Tableau 23</b> : Séroprévalence de la toxoplasmose chez 7 espèces de mammifères sauvages en Limousin.....	148
<b>Tableau 24</b> : Séroprévalence de la toxoplasmose chez 16 espèces d'oiseaux en Limousin...	150
<b>Tableau 25</b> : Diversité génétique du toxoplasme chez le poulet de plein air.....	156
<b>Tableau 26</b> : Stades d'infection des TG180.....	195

# Liste des annexes

<b>Annexe 1</b> : Position taxonomique de <i>Toxoplasma gondii</i> .....	191
<b>Annexe 2</b> : Isolats et stades de <i>Toxoplasma gondii</i> utilisés au cours de ce travail.....	192
<b>Annexe 3</b> : Production d'antigènes figurés pour le test sérologique ADHS .....	193
<b>Annexe 4</b> : Purification des oocystes de toxoplasme par flottation sur saccharose-phénol ..	196
<b>Annexe 5</b> : Solutions utilisées pour la purification des oocystes sur chlorure de césium .....	197
<b>Annexe 6</b> : Protozoaires, évoqués dans ce travail, dont le cycle évolutif est caractérisé par la persistance d'un stade infectieux dans l'environnement.....	198
<b>Annexe 7</b> : Conditions de conservation des autres protozoaires utilisés au cours de ce travail .....	199
<b>Annexe 8</b> : Références des réactifs utilisés pour déterminer l'isotype et la concentration des anticorps monoclonaux dans les surnageants de culture d'hybridomes.....	200
<b>Annexe 9</b> : Culture in vitro des stades asexués de <i>Toxoplasma gondii</i> .....	201
<b>Annexe 10</b> : Solutions utilisées pour le western-blot .....	203
<b>Annexe 11</b> : Protocole du SDS-PAGE et du transfert des protéines d'oocystes .....	206
<b>Annexe 12</b> : Couplage de l'anticorps 3G4 sur les billes Dynal M-450 Epoxy .....	208
<b>Annexe 13</b> : Couplage d'anticorps sur les billes P.A.R.I.S. BM0829.....	209
<b>Annexe 14</b> : Principe de recherche des oocystes de <i>Cryptosporidium</i> sp. et des kystes de <i>G. intestinalis</i> dans les eaux de surface (selon la norme AFNOR NF T90-455) .....	210
<b>Annexe 15</b> : Recherche des kystes tissulaires de toxoplasme par digestion pepsique .....	212
<b>Annexe 16</b> : Cartes de répartition des différents prélèvements d'eaux de surface réalisés entre mars et juillet 2005.....	213
<b>Annexe 17</b> : Tampons pour l'extraction de l'ADN des sporocystes de toxoplasme.....	217
<b>Annexe 18</b> : Séquence du gène AF146527, amorces et sondes utilisées .....	218
<b>Annexe 19</b> : Marqueurs génétiques utilisés pour le typage des isolats de toxoplasme .....	219
<b>Annexe 20</b> : Polymorphisme de longueur allélique pour cinq microsatellites considérés ....	220
<b>Annexe 21</b> : Cartes de répartition des productions ovine et bovine en France .....	221

# Liste des abréviations

AcM	Anticorps monoclonal
ADHS	Agglutination directe haute sensibilité
ADN	Acide désoxyribonucléique
AFNOR	Agence Française de Normalisation
AFSSA	Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments
ARNm	Acide ribonucléique messenger
BSA	« Bovine serum albumine »
DI50	Dose infectieuse médiane
DL100	Dose létale totale
ED	Eau distillée
ELISA	« Enzyme linked immunosorbent assay »
FITC	Isothiocyanate de fluorescéine
IFI	Immunofluorescence indirecte
Ig	Immunoglobuline
IMS	Séparation Immunomagnétique
NTU	Unité néphélométrique de la turbidité des eaux
pb	Paire de bases
PCR	« Polymerase chain reaction »
RFLP	« Restriction fragment length polymorphism »
rpm	Rotation par minute
RT-PCR	« Reverse transcriptase-PCR »
SVF	Sérum de veau fœtal
UNG	Uracyl-N-glycosylase
USEPA	« United States Environmental Protection Agency »
UV	Ultraviolet
WFB	« Wall forming body »

# **INTRODUCTION GENERALE**

Le toxoplasme (*Toxoplasma gondii*) est l'agent d'une anthroponose cosmopolite : la toxoplasmose. Ce parasite intracellulaire entretient un cycle hétéroxène facultatif entre les félins (hôtes définitifs) et les autres homéothermes (hôtes intermédiaires).

La toxoplasmose est presque toujours asymptomatique mais elle peut être sévère chez l'individu immunodéprimé ou après transmission congénitale.

L'importance médicale et vétérinaire de la toxoplasmose motive depuis 50 ans de nombreuses études épidémiologiques afin d'identifier les réservoirs et les modes de transmission du parasite (Tenter et al., 2000). La consommation de viande crue ou peu cuite contenant des kystes du parasite et l'ingestion d'oocystes avec les fruits et légumes souillés par des fèces de chats sont les deux principaux modes de contamination. Plus récemment, la consommation d'eau contaminée par les oocystes a été retenue comme facteur de risque de toxoplasmose au Brésil (Bahia-Oliveira et al., 2003). Des épidémies d'origine hydrique ont été à l'origine de toxoplasmoses symptomatiques parfois mortelles au Panama (Benenson et al., 1982), au Canada (Bowie et al., 1997) et au Brésil (Taverne, 2002).

La séroprévalence de la toxoplasmose humaine varie en fonction des zones géographiques. En Europe, elle est de 30 à 50 % dans la majorité des pays du centre et de l'ouest ; elle devient inférieure à 30 % dans le nord. Des prévalences faibles sont notées en Amérique du Nord, en Asie du Sud-Est et dans quelques pays africains (Niger, Afrique du Sud) (Tenter et al., 2000). Les prévalences les plus fortes (> 60 %) s'observent principalement parmi les pays bordant le golfe de Guinée et en Amérique latine. Ces disparités sont principalement dues à la plus grande survie des oocystes sous des climats humides. Il y a peu d'infections dans les régions où les chats sont absents (Dubey, Rollor, et al., 1997).

Les oocystes ont un rôle central dans la transmission du parasite car ils contaminent l'homme directement, ou indirectement via les animaux de boucherie. Dans la perspective d'évaluer le risque de toxoplasmose liée aux oocystes, il est nécessaire de préciser la prévalence des oocystes dans l'environnement. Cela n'est possible qu'en disposant de méthodes de détection spécifiques et sensibles car la probabilité d'isoler des oocystes dans un échantillon naturellement contaminé pris au hasard est très faible. Étudier la séroprévalence de la toxoplasmose chez les animaux herbivores est également une méthode intéressante pour évaluer indirectement la prévalence des oocystes dans l'environnement.

*Le travail que nous présentons ici s'inscrit dans la préoccupation tout à fait récente de développer de telles méthodes de détection des oocystes dans l'environnement (Kourenti et al., 2003 ; 2004 ; Villena et al., 2004).*

*La première partie de ce travail est une étude bibliographique de la biologie des oocystes, de leur rôle épidémiologique et des méthodes actuelles pour les détecter.*

*La seconde partie correspond à notre étude expérimentale. Celle-ci décrit le développement et l'application en conditions naturelles d'une nouvelle méthode de détection des oocystes dans l'eau, la séparation immunomagnétique (IMS). Elle présente également les résultats de la prévalence du parasite dans des réservoirs domestiques et sauvages susceptibles d'être infectés à partir des oocystes. Le polymorphisme génétique des toxoplasmes isolés y est comparé à celui des souches de référence.*



**PARTIE 1 :**  
**L'OOCYSTE DE TOXOPLASME**

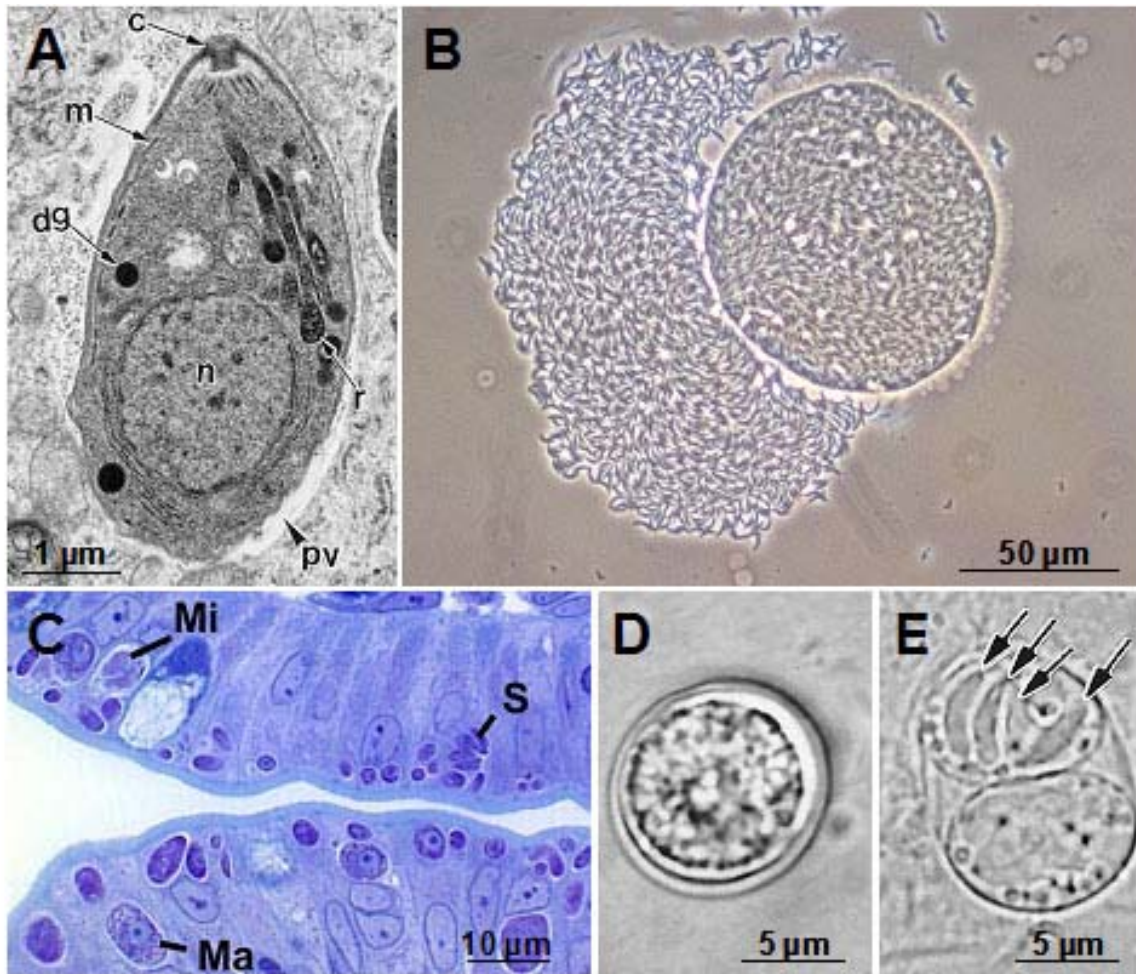
# 1. Cycle évolutif du toxoplasme

*Toxoplasma gondii* est une coccidie intestinale du chat. Elle est la seule espèce du genre *Toxoplasma* (annexe 1). Le toxoplasme est capable d'infecter tous les organismes homéothermes par l'un des trois stades évolutifs suivants : tachyzoïte, bradyzoïte ou sporozoïte (figure 1). Les tachyzoïtes augmentent la densité parasitaire chez l'hôte ; bradyzoïtes et sporozoïtes sont protégés dans des structures kystiques et permettent la transmission entre hôtes.

Le cycle parasitaire peut s'effectuer entre hôte définitif et hôtes intermédiaires (cycle sexué) ou entre hôtes intermédiaires (cycle asexué) (figure 2).

Le cycle sexué débute dans l'épithélium intestinal des félins. Une schizogonie puis une gamétogonie aboutissent à la formation d'oocystes immatures qui sont émis en grande quantité avec les fèces. Après sporulation, les oocystes sont rapidement disséminés et conservent leur pouvoir infectant dans le sol et l'eau pendant plusieurs mois. Leur ingestion par les hôtes intermédiaires entraîne le dékystement des sporozoïtes et leur conversion en tachyzoïte (phase aiguë). Une phase chronique s'établit après différenciation des tachyzoïtes en bradyzoïtes. Ces derniers se regroupent pour former des kystes qui semblent perdurer toute la vie de l'hôte, plus particulièrement dans les tissus nerveux et musculaires. Le cycle est complet quand l'hôte définitif s'infecte en ingérant une proie contenant des kystes.

Le cycle asexué a lieu entre hôtes intermédiaires. L'ingestion de kystes tissulaires est à l'origine d'une série de différenciations bradyzoïte → tachyzoïte → bradyzoïte, qui aboutit à la formation et à la persistance de kystes tissulaires.



**Figure 1: Les différents stades évolutifs de *Toxoplasma gondii*.**(A) Ultrastructure d'un tachyzoïte en microscopie électronique : c, conoïde ; dg, granule dense ; m, micronème ; n, noyau ; pv, vacuole parasitophore ; r, rhoptrie. (B) Un kyste libérant ses bradyzoïtes après digestion trypsique de la paroi kystique (photo M.L. Dardé). (C) Stades entéroépithéliaux : Ma, macrogamétocyte ; Mi, microgamétocyte ; S, schizonte (Ferguson, 2004). (D) Oocyste non sporulé. (E) Oocyste sporulé contenant deux sporocystes renfermant chacun quatre sporozoïtes (flèches) (Dubey, Lindsay, et al., 1998).

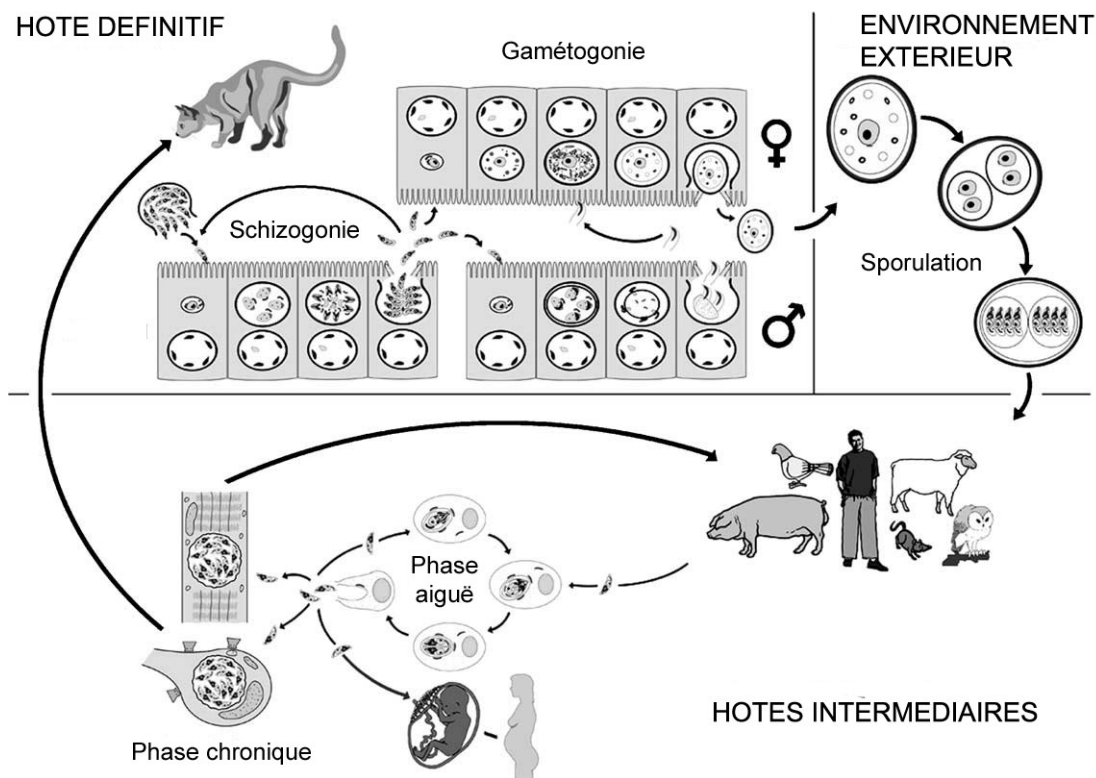


Figure 2 : Cycle évolutif de *Toxoplasma gondii* (Ferguson, 2002).

## 2. Oocystogenèse

### 2.1. Stades entéroépithéliaux

Les stades entéroépithéliaux (mérozoïte, stades sexués et oocyste) ont été décrits chez le chat domestique (*Felis catus*) après infection expérimentale par des kystes. Ce mode de contamination semble naturellement prépondérant chez les félins.

Après ingestion, la paroi kystique est détruite par les enzymes gastriques et les bradyzoïtes sont libérés dans l'estomac. La résistance relative des bradyzoïtes à la pepsine (3 heures (h) en conditions expérimentales ; Dubey, 1998a) leur permet de coloniser l'épithélium jéjunal 2 h après infection (Dubey et Frenkel, 1972). La colonisation d'un entérocyte entraîne la formation d'une vacuole parasitophore à paroi épaisse (Hutchison et al., 1971, Ferguson et al., 1974), un déplacement et une hypertrophie nucléaire (Dubey et Frenkel, 1972), et une réduction de la taille des microvillosités qui perdure jusqu'à la fin de l'émission des oocystes (Ferguson et al., 1976). Une même cellule peut héberger plusieurs stades de développement (Hutchison et al., 1971). L'infection provoque des modifications structurales des entérocytes même s'ils n'hébergent pas de parasite (Ferguson et al., 1976). Tous les stades intestinaux du parasite contiennent des granules d'amylopectine (Dubey et Frenkel, 1972).

#### 2.1.1. Mérozoïtes

Les mérozoïtes se développent au sein de schizontes de types A à E. Leur morphologie a été décrite par Dubey et Frenkel (1972) et Speer et Dubey (2005). Ferguson et al. (1974) ont décrit en microscopie électronique, un type unique, 7 jours après infection, ce qui correspond chronologiquement à un type D ou E (Dubey et Frenkel, 1972). Cette description est retenue ci-dessous.

Le jeune schizonte possède une chromatine distribuée en petites mottes (critère de différenciation avec le jeune microgamétocyte). Deux membranes en forme de dômes apparaissent près de chaque noyau et deviennent la membrane interne des futurs mérozoïtes. Les mérozoïtes se développent jusqu'à l'assimilation complète du cytoplasme du schizonte.

La membrane externe du schizonte devient au fur et à mesure du développement des mérozoïtes leur membrane externe par invagination et fusion. Les mérozoïtes formés se séparent, se retrouvent libres dans la vacuole parasitophore et quittent la cellule hôte pour infecter de nouvelles cellules.

### 2.1.2. Microgamétocyte et microgamètes mâles

Les microgamétocytes immatures ressemblent aux types D et E mais leurs noyaux sont plus petits et entourés d'un halo clair (Dubey et Frenkel, 1972). Le noyau du jeune microgamétocyte se divise pour former jusqu'à 32 noyaux qui se concentrent à sa périphérie. A partir de chaque noyau, une extrusion apparaît en dehors du microgamétocyte ; elle contient un microgamète en développement (Ferguson et al., 1974). A maturité, le microgamète est biflagellé et possède un noyau dense et allongé et une mitochondrie unique. Les microgamètes s'échappent du microgamétocyte et se trouvent libre dans la vacuole parasitophore. Chaque microgamétocyte (7-10 x 5-8  $\mu\text{m}$ ) donne naissance à 6 à 32 microgamètes, en moyenne 12 (4-5  $\mu\text{m}$ , flagelle 6-10  $\mu\text{m}$ ). Les microgamétocytes représentent 2 à 4% du total des gamétocytes matures (Hutchison et al. 1971 ; Dubey et Frenkel, 1972).

### 2.1.3. Macrogamétocyte et macrogamète femelle

Les macrogamétocytes immatures ont un grand noyau et ressemblent aux types D et E (Dubey et Frenkel, 1972).

La phase de différenciation en macrogamète est marquée par l'accumulation de matériel nourricier sous forme de granules lipidiques et polysaccharidiques, et par l'apparition d'organites spécialisés dans la formation de la paroi de l'oocyste appelés « wall forming bodies » (WFB) (Ferguson et al., 1975). A maturité, le macrogamète mesure 7-8 x 4-7  $\mu\text{m}$  et est entouré d'une pellicule percée de nombreux micropores (Dubey et Frenkel, 1972).

### 2.1.4. Fécondation

La fécondation du macrogamète par un microgamète n'a jamais été observée. Compte tenu du sex ratio très favorable aux macrogamètes, la fécondation ne serait pas le seul processus intervenant dans la production de plusieurs dizaines de millions d'oocystes. Ainsi,

les macrogamètes non fécondés pourraient subir une parthénogenèse pour former des oocystes capables de sporuler (Ferguson, 2002).

### 2.1.5. Formation de la paroi de l'oocyste

Le stimulus déclenchant la formation de la paroi de l'oocyste pourrait être la fécondation du macrogamète. La paroi de l'oocyste est composée de plusieurs couches qui apparaissent au cours du développement du jeune oocyste. L'apparition d'une couche est liée à la disparition concomitante d'un type de WFB (ou W dans les figures 3A, 3B et 3D).

Les WFB1 mesurent 0,35  $\mu\text{m}$  de diamètre et sont protégés par une membrane unique. Ils se développent par bourgeonnement à partir du réticulum endoplasmique lisse (REL). Deux populations de WFB1 coexistent dans le macrogamète mature. Les WFB1a sont périphériques, ont un contenu homogène dense aux électrons et réagissent avec un sérum polyclonal anti-MIC4 (antigène de micronème) (Ferguson et al., 2000 ; Brecht et al., 2001) Les WFB1b occupent une position plus centrale, ont un contenu hétérogène et sont MIC4 négatifs.

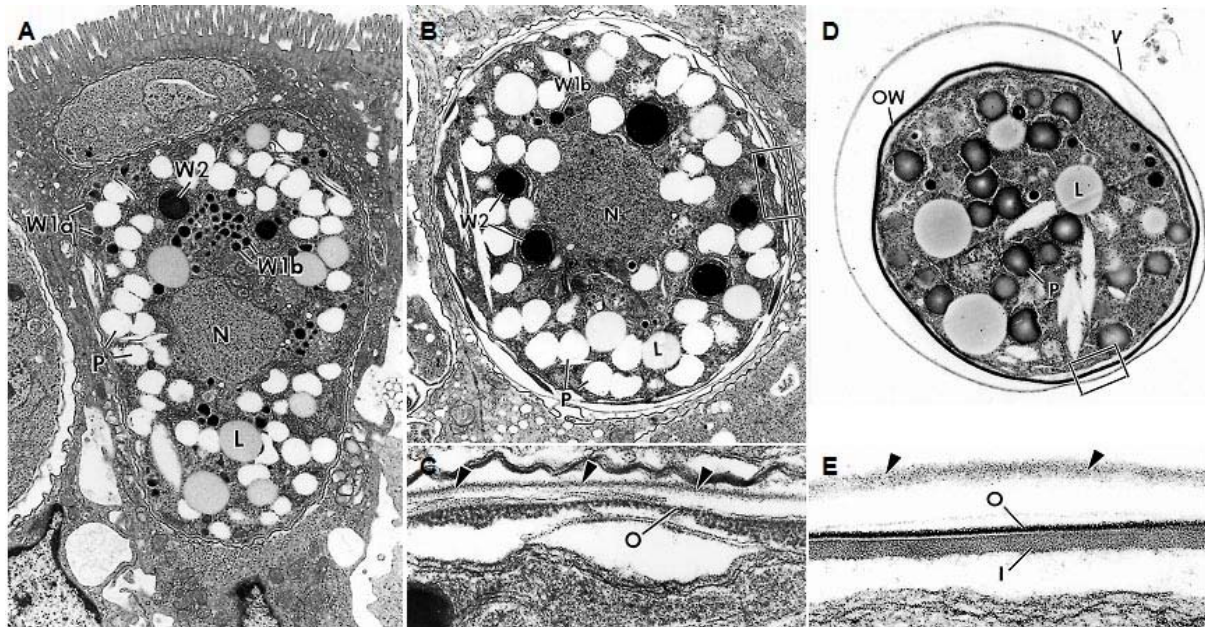
Les WFB2 se forment dans les lacunes du réticulum endoplasmique rugueux (RER). A maturité, ils mesurent 1,2  $\mu\text{m}$ , sont moins denses aux électrons et moins nombreux que les WFB1. Ils sont limités par une double membrane dont la plus externe provient du RER. Les WFB2 sont MIC4 négatifs (Ferguson et al., 2000).

La formation de la paroi de l'oocyste non sporulé débute par l'agrégation de matériel de nature inconnue à l'extérieur de la pellicule du macrogamète (couche 1). Une deuxième puis une troisième couche (parfois confondues) apparaissent sous la couche 1. Les couches 1, 2 et 3 forment un voile lâche MIC4 positif entourant l'oocyste (Ferguson et al., 2000) (figures 3B, 3C et 3E). Sa formation est associée à la disparition des WFB1a, auxquels le nom de VFB (pour veil-forming bodies) a été donné récemment (Ferguson et al, 2000). La fonction de ce voile n'est pas connue. Il peut être observé après émission et sporulation (Speer et al, 1998).

La formation de la couche 4 est associée à la disparition des WFB1b (figure 3B). La couche 4 se forme entre le voile et la pellicule (figure 3C). La couche 4 est électron-dense (figure 3E). La couche 5, plus épaisse, se forme entre la couche 4 et la pellicule. Elle apparaît



moins dense aux électrons. La formation de cette couche est associée à la disparition des WFB2 (figures 3D et 3E).



**Figure 3 : Formation de la paroi de l'oocyste non sporulé de toxoplasme observée en microscopie électronique** (Ferguson et al., 2000). (A) Macrogamète mature contenant autour de son noyau (N) des inclusions lipidiques (L) et polysaccharidiques (P) et trois sous-populations de wall-forming bodies (W1a, W1b et W2). (B) Jeune oocyste dont la paroi est partiellement formée : les W1a ont disparu et le nombre de W1b a nettement diminué. (C) Détail de la paroi du jeune oocyste montrant le voile formé (flèches) et la couche 4 externe en développement (O). (D) Oocyste intra-luminal dont la paroi (OW) est entourée d'un voile lâche (V). (E) Détail de la paroi de (D) montrant le voile lâche (flèches), la couche 4 externe (O) et la couche 5 interne (I).

### 2.1.6. Émission des oocystes

Les oocystes non sporulés sont libérés dans la lumière intestinale et sont émis quotidiennement avec les fèces pendant quelques jours. Ils ont une structure identique à celle des oocystes présents dans les entérocytes, notamment un cytoplasme contenant un nucléoplasme amorphe et un nucléole distinct (Ferguson et al., 1975 ; Ferguson et al., 1979a).



L'ultrastructure de la paroi de l'oocyste fraîchement émis est inconnue mais pourrait ressembler à la description précédente.

L'infection par des bradyzoïtes aboutit presque toujours à l'émission d'oocystes en grande quantité (entre  $10^7$  et  $10^8$  au total) avec une période pré-patente de 3 à 10 jours (j) et une période patente de 15 à 21 j. Un pic quantitatif est souvent constaté entre les 2<sup>ème</sup> et 4<sup>ème</sup> j d'émission. La quantité émise est indépendante de la taille de l'inoculum puisqu'un seul bradyzoïte ingéré engendre plusieurs dizaines de millions d'oocystes (Dubey, 2001). Au contraire, une contamination par des tachyzoïtes ou des oocystes n'entraîne que dans 10 à 30% des cas une émission d'oocystes, généralement moins profuse et moins longue, et après une période pré-patente supérieure à 19 j (Dubey, 1996b ; 2002a).

## 2.2. Sporulation

La sporulation est un processus asynchrone. Dans une suspension, environ 20% d'oocystes semblent incapables de sporuler (données expérimentales personnelles). Elle débute 6 h après l'émission (Ferguson et al., 1979a). Le noyau de l'oocyste non sporulé subit une méiose réductionnelle suivie d'une mitose des deux noyaux précédemment formés. Les quatre noyaux haploïdes se trouvent contenus dans deux sporoblastes sphériques issus d'une division cytoplasmique (Ferguson et al., 1979a). Puis les sporoblastes s'allongent pour former les sporocystes (Ferguson et al., 1979b). Les deux membranes externes des sporoblastes deviennent la membrane externe du sporocyste et le plasmalemme du cytoplasme devient la membrane interne. Dans chaque sporocyste, deux sporozoïtes se développent à partir de plaques denses situées près de chaque noyau. Puis après une division nucléaire, quatre sporozoïtes sont complètement formés, laissant un corps résiduel entouré d'une membrane unique (Ferguson et al., 1979c).

### 2.2.1. Paramètres physico-chimiques

Le succès de la sporulation dépend de la température, des conditions d'aérobiose et d'hygrométrie. Expérimentalement, la sporulation est d'autant plus longue que la température est faible : 21 j à 11°C contre 48 h à 25°C (Dubey, Miller et al., 1970b). D'une façon générale, les oocystes perdent leur capacité à sporuler après congélation 1 j à -21°C ou 7 j à -

6°C (Frenkel et Dubey, 1973) ou après exposition à la chaleur 24 h à 37°C ou 10 minutes (min) à 50°C (Dubey, Miller et al., 1970b). La sporulation est encore possible après conservation des oocystes non sporulés à 4°C pendant 11 semaines (Lindsay, Blagburn et al., 2002).

En conditions anaérobies, la sporulation peut être incomplète (arrêt au stade sporocyste) et produire des oocystes non infectants (Dubey, Miller et al., 1970a ; 1970b). La sporulation peut reprendre partiellement (4%) en conditions aérobies après 30 j d'anaérobiose (Dubey, Miller et al., 1970b). Expérimentalement, la sporulation est possible dans différents milieux de conservation (Dubey, Miller et al., 1970b) : 74 à 80% des oocystes développent leur infectiosité dans de l'acide sulfurique (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) à 2% ou dans du bichromate de potassium (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>) à 2,5%, contre seulement 36% après sporulation dans l'eau. En conditions naturelles, la sporulation tient probablement compte de paramètres physico-chimiques beaucoup plus complexes afin qu'un maximum d'oocystes deviennent infectants. La sporulation est possible dans l'eau de mer à 24°C (eau de mer artificielle à 15 et 32 ppt<sup>1</sup>) (Lindsay, Collins et al., 2003).

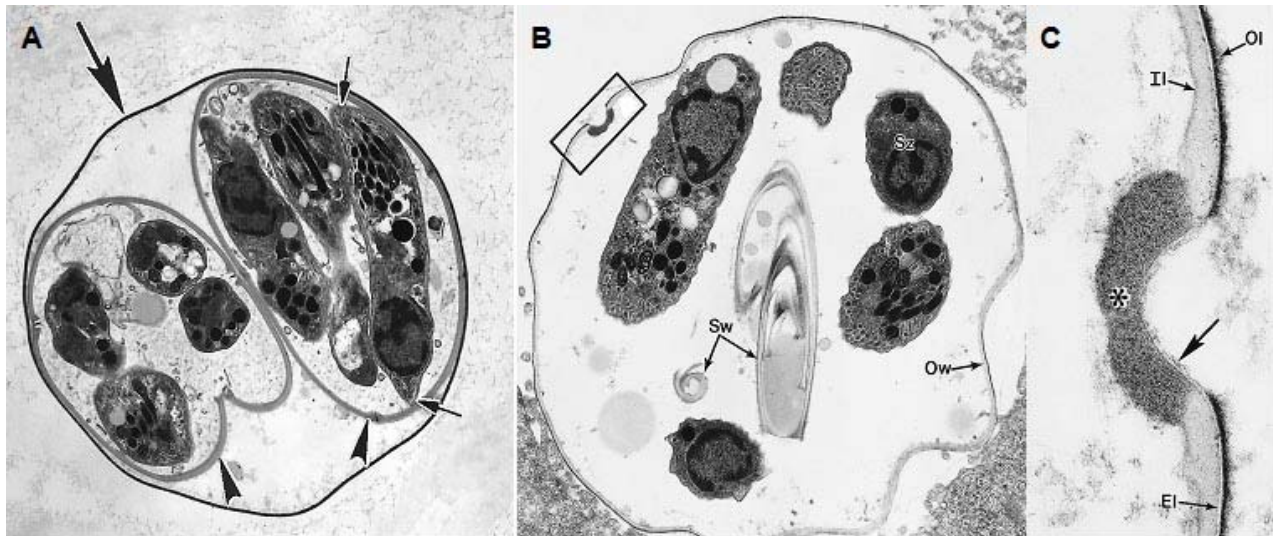
### 2.2.2. Ultrastructure

La paroi de l'oocyste sporulé est constituée, d'après Speer et al (1998), de trois couches (figure 4C) : une couche externe (couche 4 selon la nomenclature du paragraphe 2.1.5.), dense aux électrons, de 30,5 nm d'épaisseur, une couche médiane vestigiale (espace inter couches 4 et 5) peu dense aux électrons de 8-10 nm d'épaisseur, et une couche interne, moyennement dense aux électrons, de 61 nm d'épaisseur (couche 5). Un micropyle unique est réparti aléatoirement à la surface de l'oocyste sporulé (figure 4C). Sa fonction est inconnue mais il pourrait représenter un site sensible aux actions du CO<sub>2</sub> et d'enzymes au cours des étapes précoces du dékystement des sporozoïtes.

La paroi du sporocyste possède 2 couches distinctes avec une couche externe mince, dense aux électrons, et une couche interne plus épaisse et moins dense. La couche interne est composée de quatre plaques incurvées maintenues entre elles par quatre sutures épaisses.

---

<sup>1</sup> *part per thousand* ; 15 ppt, soit environ 18 g de sels dissouts dans 1 L d'eau (correspond à la salinité de la mer du Nord).



**Figure 4 : Oocyste sporulé de toxoplasme observé en microscopie électronique** (Dubey, Lindsay et al., 1998 ; Speer et al., 1998). (A) Oocyste sporulé protégé par sa paroi (grande flèche) contenant deux sporocystes (têtes de flèches) renfermant chacun quatre sporozoïtes (petites flèches). (B) Étape tardive du dékystement montrant des sporozoïtes libres (Sz) et des plaques sporocystiques enroulées (Sw), protégés par la paroi de l'oocyste (Ow). (C) Détail de la paroi de l'oocyste montrant la couche 4 externe (O1) et la couche 5 interne (I1) séparées par une couche médiane vestigiale (EI). Le micropyle (\*) possède une couche externe et une couche médiane amincie en prolongement de celles de l'oocyste (flèche) et une couche interne épaisse (\*).

L'étude ultrastructurale du sporozoïte nécessite un dékystement préalable (Ferguson et al., 1979d). La paroi de l'oocyste est fragilisée par un traitement mécanique et/ou chimique à l'hypochlorite de sodium suivi d'une incubation sous CO<sub>2</sub> (Christie et al., 1978 ; Speer et al., 1998 ; Freyre et Falcón, 2004). L'action enzymatique de la trypsine et des sels biliaries provoque la rupture des sporocystes au niveau des sutures et entraîne la libération des sporozoïtes (Christie et al., 1978) (figure 4A). Les plaques forment alors des structures enroulées (figure 4B) laissant des résidus sporocystiques (granules d'amylopectine et corps lipidiques) (Christie et al., 1978 ; Speer et al., 1998). Sur le plan ultrastructural, le sporozoïte peut être différencié du tachyzoïte et du bradyzoïte par l'aspect des rhoptries en microscopie électronique (tachyzoïte : rhoptries labyrinthiques ; bradyzoïte : uniformes ; sporozoïte : uniformes et labyrinthiques), le nombre de micronèmes, et par le nombre et la taille des granules denses, des grains d'amylopectine et des inclusions lipidiques (Speer et al., 1998).

Le sporozoïte de *T. gondii* ne possède pas de corps cristalloïde contrairement à celui d'*Hammondia hammondi* (Riahi, 1997).

### 2.2.3. Antigènes

Les antigènes du stade oocyste/sporozoïte sont moins bien connus que ceux des stades asexués, même s'il existe des antigènes communs aux différents stades évolutifs (Ferguson, 2004). Les principaux antigènes identifiés appartiennent au sporozoïte.

Deux protéines de 25 et 67 kDa (Sp25 et Sp67) sont majoritaires à la surface du sporozoïte (Kasper et al., 1984 ; Kasper et Ware, 1985 ; Radke et al., 2004). Après infection par des oocystes, Sp67 et une protéine additionnelle de 190 kDa (Sp190) induisent une réponse IgM et IgG au cours de la phase aiguë puis essentiellement une réponse IgG en phase chronique (Kasper et Ware, 1985). La réponse IgM ne semble pas être dirigée contre des déterminants glycoprotéiques. Sp25 induit uniquement une réponse IgM lors de la phase aiguë. Bien que présents transitoirement dans un organisme, les oocystes expriment des protéines capables de provoquer un switch IgM/IgG, au cours de la phase chronique. D'autres protéines, notamment celles de granules denses, sont présentes dans le sporozoïte mais toutes ne sont pas mobilisées au cours de l'infection cellulaire (Tilley et al., 1997). Le profil d'expression protéique est modifié lors de la conversion en tachyzoïte (Speer et al., 1995 ; Radke et al., 2004).

La connaissance des antigènes des parois de l'oocyste et du sporocyste se résume aux études suivantes :

- Ferguson et al. (2000) ont montré la présence d'une protéine MIC4-like dans les WFB1a puis dans le voile lâche entourant le macrogamète mature et l'oocyste non sporulé. Par la suite, MIC4 (61 kDa) n'est plus exprimé par l'oocyste jusqu'à la formation complète des sporozoïtes (Brecht et al., 2001). L'expression d'un antigène de micronème au cours de l'oocystogenèse est unique chez le toxoplasme mais a déjà été observée chez *Cryptosporidium parvum* (Bonnin et al., 1993).
- Deux anticorps monoclonaux spécifiques de la paroi interne de l'oocyste sporulé ont été obtenus par Kasper et al. (1984) après immunisation avec des lysats d'oocystes sporulés. Un troisième clone a montré une réactivité croisée entre la

paroi, le sporozoïte et le tachyzoïte. Ces trois anticorps ne marquant pas les oocystes intacts, Kasper et al. (1984) ont conclu en l'absence de structures antigéniques dans la paroi externe.

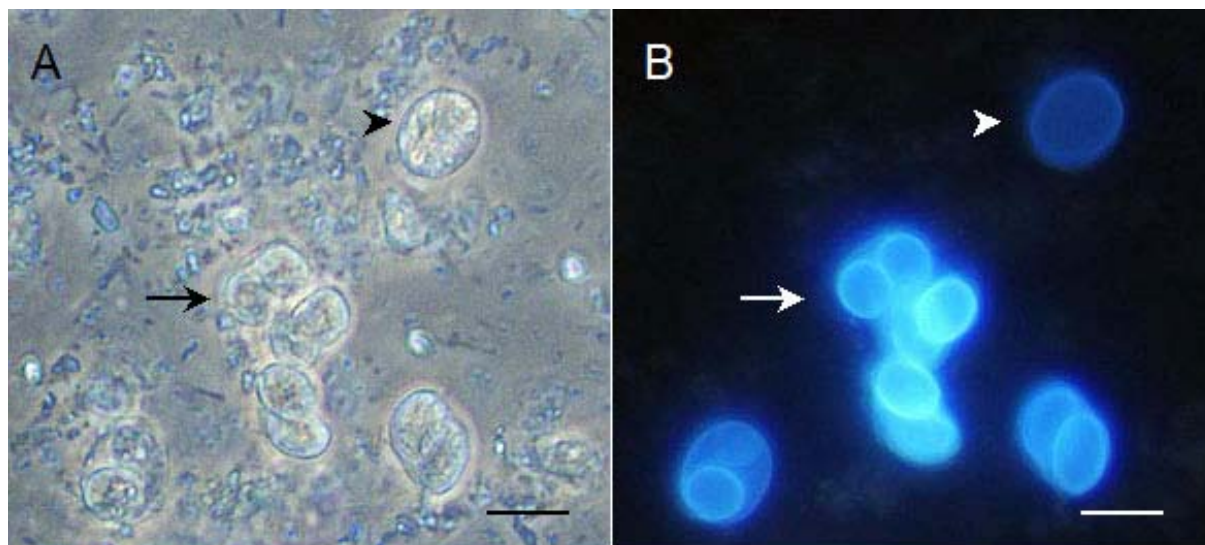
- Récemment, la protéine putative *TgOWP1*, homologue des protéines de la paroi externe de l'oocyste de *Cryptosporidium parvum* (ou protéines COWP), a été identifiée dans le génome du toxoplasme (<http://www.toxodb.org>) (Templeton et al., 2004). Le séquençage de *TgOWP1* met en évidence de nombreux domaines riches en cystéine et la plus grande homologie avec COWP6. L'obtention d'un anticorps monoclonal qui permettra la caractérisation de cette protéine est en cours (Aubert D. et Villena I., communication personnelle).

#### 2.2.4. Autofluorescence

Les oocystes sporulés et non sporulés émettent une fluorescence bleue naturelle sous excitation ultraviolette (UV) (filtre d'excitation : 330-385 nm, miroir dichroïque ; 400 nm, filtre d'émission ; 420 nm) (Lindquist et al., 2003 ; Dumètre et Dardé, 2004). Seules les parois des oocystes et des sporocystes sont fluorescentes (**figure 5**). Cette fluorescence naturelle est partagée par les oocystes d'autres coccidies phylogénétiquement proches de *T. gondii*, comme *Besnoitia darlingi*, *Cyclospora cayetanensis*, *Eimeria maxima*, *Eimeria tenella*, *Hammondia hammondi*, *Hammondia heydorni*, *Isospora belli*, *Neospora caninum* et *Sarcocystis neurona* (Ortega et al., 1997; Berlin et al., 1998 ; Belli et al., 2003 ; Lindquist et al., 2003).

L'origine de cette autofluorescence n'est pas bien identifiée. Une étude de l'oocyste d'*Eimeria maxima* a montré l'oxydation de glycoprotéines riches en tyrosine dans les WFB, leur incorporation dans la paroi en développement, et la présence de formes oxydées de la tyrosine (dityrosine et 3,4-dihydroxyphénylalanine (DOPA)) dans des extraits d'oocystes (Belli et al., 2003). La rigidité de la paroi est assurée par le « cross-linking » des protéines par des ponts dityrosiques et par une oxydation des protéines contenant des groupes DOPA (ou processus de « quinone tanning »). L'autofluorescence bleue des parois est la réponse à l'excitation UV de la dityrosine et dans une moindre mesure des groupes DOPA oxydés (Lerher et Fasman, 1967 ; Belli et al., 2003). L'autofluorescence et la rigidité de la paroi de

l'oocyste sont donc deux propriétés liées l'une à l'autre. Il est possible que le développement de la paroi de l'oocyste de *Toxoplasma gondii* soit analogue à celui d'*E. maxima*.



**Figure 5 : Autofluorescence des oocystes non sporulés et sporulés de toxoplasme.** (A) Oocystes non sporulé (tête de flèche) et sporulés (flèche) parmi des débris fécaux (contraste de phase). (B) Une observation sous UV facilite la détection des oocystes (filtre d'excitation : 330-385 nm, miroir dichroïque : 400 nm, filtre d'émission : 420 nm) (x400, échelle = 10 µm).

### **3. Résistance aux conditions environnementales et aux procédés d'inactivation**

Cette résistance correspond au maintien du pouvoir infectant des sporozoïtes en présence d'agents physico-chimiques d'inactivation. Elle est due à la rigidité des parois de l'oocyste et du sporocyste. Il est important d'évaluer cette résistance pour minimiser la transmission du parasite via les matrices alimentaires.

#### **3.1. Facteurs physiques**

##### **3.1.1. Température**

La résistance à la température a été testée pour différentes matrices, en conditions naturelles ou expérimentales : fèces, sol, baies, eau (potable ou non), eau de mer (tableau 1). Pour comparaison, les oocystes sporulés conservés dans une solution de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> à 2% à 4°C restent infectants 578 j (Dubey et Beattie, 1988) sans perte d'infectiosité au cours des douze premiers mois (Dubey, Lunney et al., 1996).

Dans l'eau, l'infectiosité est maintenue pendant 54 mois à 4°C (Dubey, 1998b) ou 548 j à 20-22°C (Hutchison, 1967). Les oocystes, sensibles à la chaleur, sont rapidement inactivés à partir de 55°C. Au contraire, une exposition constante à -21°C pendant 28 j n'empêche pas l'infection (Frenkel et Dubey, 1973). Les oocystes restent infectants après 180 j à 4 et à 24°C dans de l'eau de mer à 15 ppt (Lindsay, Collins et al., 2003).

La résistance dans les matrices solides (sol et aliments) est moins importante : les oocystes restent tout de même infectants pendant 30 à 410 j selon la température et les conditions d'expositions des suspensions (tableau 1). Les suspensions soumises aux fluctuations naturelles de température et d'exposition maintiennent leur pouvoir infectant pendant 46 j à 18 mois selon les matrices. L'impact d'une contamination fongique ou bactérienne sur la survie des oocystes n'a pas été évalué.

Température (°C)	Conditions	Durée de survie <sup>a</sup>	Références
<b>En laboratoire</b>			
-20	Eau	28 j	Frenkel et Dubey, 1973
-10/-5	Eau	106 j	Dubey, 1998b
0	Eau	13 mois	Dubey, 1998b
+4	Eau	54 mois	Dubey, 1998b
	<i>Baies</i>	<i>56 j</i>	Kniel et al., 2002
	<i>Fèces</i>	<i>214–410 j<sup>b</sup></i>	Yilmaz et Hopkins, 1972
+4/+24	Eau de mer à 15 ppt	180 j	Lindsay, Collins et al., 2003
+20/+22	Eau	548 j	Hutchison, 1967
+22,5	Eau	306–410 j <sup>b</sup>	Yilmaz et Hopkins, 1972
	<i>Fèces</i>	<i>107–306 j<sup>b</sup></i>	
+23→+29	<i>Sols humides</i>	<i>117 j</i>	Dubey, Miller et al., 1970a
+30	Eau	107 j	Dubey, 1998b
+35	Eau	32 j	Dubey, 1998b
+37	Eau	91–306 j <sup>b</sup>	Yilmaz et Hopkins, 1972
	<i>Fèces</i>	<i>30–153 j<sup>b</sup></i>	
+40	Eau	9 j	Dubey, 1998b
+45	Eau	1 j	Dubey, 1998b
+50	Eau	30–60 min	Dubey, Miller et al., 1970a ; Dubey, 1998b
+55/+58	Eau	< 15 min	Kutičić et Wikerhauser, 1996; Dubey, 1998b
+60/+70	Eau	< 1 min	Dubey, 1998b
<b>En conditions naturelles</b>			
-20→+35	<i>Fèces dans le sol</i>	<i>18 mois</i>	Frenkel et al., 1975
-6→+39	Eau	122–306 j / 153–410 j <sup>c</sup>	Yilmaz et Hopkins, 1972
	<i>Fèces</i>	<i>46–183 j / 76–334 j<sup>c</sup></i>	
+15→+30	Fèces dans le sol	56–357 j	Frenkel et al., 1975
+20→+27	<i>Sol humide</i>	<i>106 j</i>	Ruiz et al., 1973



**Tableau 1: Survie des oocystes sporulés de toxoplasme dans l'eau et les matrices solides (*en italique*).** <sup>a</sup> Durée de l'infectiosité globale de la suspension d'oocystes évaluée par inoculation à la souris. <sup>b</sup> Durée de l'infectiosité globale d'une suspension découverte (sujette à la dessiccation) – durée de l'infectiosité globale d'une suspension couverte. <sup>c</sup> Durée de l'infectiosité globale d'une suspension découverte – d'une suspension couverte, exposées au soleil / ou placées à l'ombre.

### 3.1.2. Dessiccation

Les oocystes sporulés dans des fèces de chats sont infectants 32 jours sous 100 % d'humidité à 22-26°C, 18 jours à 80%, 11 jours à 37%, et ne sont inactivés qu'après 8 jours à 0% (Frenkel et Dubey, 1972). Des suspensions pures d'oocystes sont moins résistantes (Dubey, Miller et al., 1970a ; Frenkel et Dubey, 1972). En conditions naturelles, l'exposition directe des matrices solides aux rayonnements solaires accélère la perte d'infectiosité (tableau 1) (Yilmaz et Hopkins, 1972 ; Frenkel et al., 1975).

### 3.1.3. Rayonnements

Les rayonnements indirectement ionisants ( $\gamma$  et X) sont utilisés pour améliorer la durée de conservation des aliments (Farkas, 1998). Des doses de 2 à 7 kilograys (kGy) détruisent la plupart des bactéries pathogènes non sporulées (traitement équivalent à une pasteurisation). Le pouvoir infectant des parasites présents dans la viande et le poisson est diminué à des doses de 0,1 à 10 kGy (Farkas, 1998). Seuls les effets des rayonnements  $\gamma$  ont été étudiés sur des baies contaminées par des oocystes de toxoplasme.

Le pourcentage d'oocystes sporulés diminue avec l'augmentation de la dose d'irradiation (0,2 à 0,8 kGy) (Dubey, Thayer et al., 1998). Environ 50% des oocystes ne sporulent pas après un traitement à 0,6 kGy et les oocystes ayant réussi à sporuler n'induisent pas de toxoplasmose sérologique. Au contraire, des oocystes sporulés irradiés à 0,35 kGy sont infectants pour la souris. A des doses supérieures, l'inoculation d'oocystes sporulés irradiés entraîne un dékystement des sporozoïtes et le développement d'une réponse immunitaire, mais les sporozoïtes ne peuvent plus initier la multiplication du parasite (Dubey, Jenkins et al., 1996 ; Dubey, Thayer et al., 1998).

D'autres rayonnements (UV, infrarouges, micro-ondes) utilisés dans le traitement de l'eau, la conservation ou la préparation des aliments n'ont pas été testés.

### 3.1.4. Hautes pressions

Un traitement des aliments par hautes pressions peut se substituer à la pasteurisation. Il est utilisé dans une gamme de 100 à 300 mégapascals (MPa) (Delacour et al., 2002). Des

oocystes, exposés 1 min à des pressions comprises entre 100 et 550 Mpa, perdent leur infectiosité à partir de 340 MPa (Lindsay, Collins et al, 2004a).

## 3.2. Facteurs chimiques

### 3.2.1. Acides et bases

Plusieurs solutions acides ( $H_2SO_4$  à 2%,  $K_2Cr_2O_7$  à 2,5%) sont d'excellents milieux de sporulation et de conservation des oocystes : l'infectiosité des oocystes peut y être maintenue pendant plus d'un an à 4°C (Dubey, Miller et al., 1970a ; 1970b). Cependant, une exposition de 24 h à de fortes concentrations (>50%) en acide sulfurique et en acide nitrique inactive les oocystes (Dubey, Miller et al., 1970a). La résistance aux solutions basiques est moins importante. L'infectiosité est diminuée d'un facteur 100 après 1 h dans une solution de NaOH à 10%, d'un facteur 1000 dans une solution de NaOH à 20% (Dubey, Miller et al., 1970a). L'inactivation totale d'une suspension d'oocystes peut être obtenue après 24 h dans une solution de NaOH à 6% (Dubey et Beattie, 1988).

### 3.2.2. Désinfectants et détergents

La résistance à l'hypochlorite de sodium (NaClO) a été la plus étudiée (Dubey, Miller et al., 1970a). Si la paroi externe de l'oocyste est détruite par une solution à 5,25%, cette concentration est insuffisante pour tuer les oocystes après 30 min d'exposition. De même, une inactivation totale n'est pas obtenue après une exposition des oocystes à des concentrations de 8,3 à 12,5% pendant 30 min ou de 6% pendant 24 h. La résistance des oocystes aux concentrations de chlore habituellement utilisées pour la désinfection de l'eau potable a été évaluée récemment. Villena (2004) a montré par bioessai l'infectiosité d'une suspension de  $10^3$  oocystes soumis à différents procédés de chloration pendant 4 h. Ces traitements sont également inefficaces sur les oocystes de cryptosporidies, alors que l'ozonation apparaît supérieure (Corona-Vasquez et al., 2002). L'ozonation n'a pas été testée sur les oocystes de toxoplasme.

D'autres agents chimiques inactivent le toxoplasme mais leur usage domestique paraît inapproprié. Les oocystes perdent leur infectiosité après un passage dans l'ammoniaque à

28 % pendant 10 min ou après 3 h avec des concentrations à usage domestique (Frenkel et Dubey, 1972). Les oocystes sont tués également par une solution iodée contenant 7% d'iode ( $I_2$ ) et 5% de iodure de potassium (KI) pendant 30 min (Frenkel et Dubey, 1972) ou dans du formol à 10% pendant 4 j (Ito et al., 1975). Les alcools ne sont pas efficaces, hormis l'éthanol pur (99 %) après 24 heures de contact (Ito et al., 1975).

La résistance aux détergents est importante puisque des solutions contenant 0,1% de polyoxyéthylènesorbitan monoléate (Tween 80) ou de sodium dodécyl sulfate (SDS), ne tuent pas les oocystes après 24 h d'exposition (Dubey, Miller et al., 1970a).

### 3.2.3. Enzymes

Les oocystes résistent aux attaques enzymatiques du tube digestif jusqu'au dékystement des sporozoïtes. Expérimentalement, une solution pepsique (activité biologique 1:10000) à 1% (pH 1,3) ou une solution trypsique (activité biologique 1:250) à 0,5% (pH 7,6) diminue d'un facteur 10 l'infectiosité des oocystes après une exposition de 1 h à 37°C (Dubey, Miller et al., 1970a). Des oocystes incubés dans des solutions de chymotrypsine, streptokinase, pronase, acétylcystéine et papaïne restent infectants, sans autre précision, après une exposition de 1 h à 37°C (Dubey, Miller et al., 1970a). L'action enzymatique seule, en l'absence d'un stimulus mécanique, semble ainsi avoir peu d'effets sur la paroi de l'oocyste de toxoplasme (Freyre et Falcon, 2004). Des résistances similaires sont rapportées pour les oocystes d'*Eimeria tenella* (Ryley, 1973) et de *Cryptosporidium parvum* (Harris et Petry, 1999).

## 4. Importance des oocystes dans la transmission de la toxoplasmose

### 4.1. Réservoir d'émission

#### 4.1.1. Chat domestique (*Felis catus*)

La population de chats domestiques (*Felis catus*) est estimée à 8 millions en France et à 400 millions dans le monde (Legay, 1986). Les toxoplasmoses félines symptomatiques sont exceptionnelles (Dubey et Beattie, 1988). La transmission verticale ne semble pas jouer de rôle épidémiologique important (Dubey, 1977).

La multiplicité des tests sérologiques utilisés dans les différentes études de séroprévalence rend difficile une comparaison des données (Tenter et al., 2000). La séroprévalence varie avec l'âge, le sexe et le mode de vie des chats. Les anticorps sont généralement détectés après le sevrage (>6-10 semaines). Les mâles, plus territoriaux et plus enclins à chasser que les femelles, sont les plus exposés. Les séroprévalences élevées (>55%) sont retrouvées parmi les chats qui évitent tout contact avec l'homme (Dubey, 1973 ; Dubey, Saville et al., 2002) ou qui vivent dans des zones de transmission toxoplasmique importante (Dubey, Navarro et al., 2004). Au contraire, les chats vivant en intérieur et nourris avec une alimentation industrielle sont moins infectés (<40%). Quelque soit le mode de vie des chats, la séroprévalence est plus faible en Asie (6-33%) qu'ailleurs (Tenter et al., 2000). En France, la séroprévalence est d'environ 40 à 60% (Pestre-Alexandre et al., 1984 ; Cabannes et al., 1997).

La quantité d'oocystes émis semble plus importante chez les jeunes mâles (<1 an) (Dubey, Hoover et al., 1977). La fin de l'émission correspond au développement d'une immunité protégeant des réinfections (Dubey et Frenkel, 1972 ; Sheffield et Melton, 1976 ; Frenkel et Smith, 1982 ; Davis et Dubey, 1995). Pourtant, une réexcrétion moins importante d'oocystes a été montrée expérimentalement chez des chats infectés puis réinfectés par une souche de génotype différent de la première (Dubey et Frenkel, 1974 ; Dubey, 1995). Une

dénutrition, une corticothérapie (Dubey et Frenkel, 1974), et des infections parasitaires (Dubey, 1976) peuvent aussi favoriser des réexcrétions.

Étant donné la brièveté de l'émission des oocystes dans la vie d'un chat (2-3 semaines) et la rareté des réinfections, l'examen parasitologique des selles n'est pas une technique fiable de dépistage de la toxoplasmose féline. Par cette technique, seulement 2% des chats sont trouvés excréteurs à un moment donné (Dubey et Beattie, 1988 ; Jackson et Hutchison, 1989 ; Dubey, 2004).

#### 4.1.2. Félins sauvages

Dix-sept espèces de félins sauvages sont connues comme hôtes définitifs du toxoplasme. (Lukesova et Literak, 1998). Expérimentalement, avec des souches de toxoplasme provenant du cycle domestique, le pourcentage d'animaux excréteurs est plus faible et la quantité émise d'oocystes est moins importante que pour des chats placés dans les mêmes conditions (Jewell et al., 1972 ; Miller et al., 1972).

La séroprévalence de la toxoplasmose a été surtout étudiée parmi les populations sauvages de félins américains (Aramini et al., 1998 ; Labelle et al., 2001 ; Zarnke et al., 2001 ; Kikuchi et al., 2004 ; Riley et al., 2004) ou chez des animaux captifs (Zhang et al., 2000 ; Silva et al., 2001 ; Kikuchi et al., 2004) Comme chez le chat domestique, la séroprévalence varie en fonction de l'âge et du sexe, les mâles adultes étant les plus infectés (Kikuchi et al., 2004). Elle est plus élevée en régions intertropicales (50-75%) (Silva et al., 2001 ; Kikuchi et al., 2004) qu'en milieu arctique (15%) (Zarnke et al., 2001).

Le rôle direct des félins sauvages dans l'épidémiologie de la toxoplasmose humaine est mal connu. Les oocystes qu'ils émettent pourraient être à l'origine de certains cas humains de toxoplasmoses sévères (Benenson et al., 1982 ; Aramini et al., 1998 ; 1999 ; Carme et al., 2002).

## 4.2. Dissémination et prévalence dans les matrices environnementales

### 4.2.1. Sol

L'habitude des félins d'enterrer leur fèces permet une contamination des dix premiers centimètres de la surface du sol et empêche une dessiccation des oocystes (Frenkel et al., 1975 ; Aramini et al., 1999). Des oocystes ont ainsi été isolés plus volontiers de sols humides et ombragés (Ruiz et al., 1973). Les eaux de ruissellement et la microfaune du sol favorisent la dissémination du parasite. Les vers de terre, maintenus au contact de sols contaminés, sont capables de transmettre l'infection (Frenkel et al., 1975 ; Ruiz et Frenkel, 1980 ; Bettiol et al., 2000). En surface, d'autres invertébrés (cafards, mouches) et leurs fèces peuvent également être porteurs ou contenir des oocystes infectants (Wallace, 1973 ; Frenkel et al., 1975 ; Smith et Frenkel, 1978).

Des oocystes ont été isolés du sol après des cas groupés de toxoplasmose au Royaume-Uni et au Brésil (Fleck et al., 1972 ; Coutinho et al., 1982). En dehors de tout contexte épidémique, des bio-essais positifs chez la souris ont été obtenus à partir de sols naturellement contaminés (Dubey et Beattie, 1988 ; Ruiz et al., 1973 ; Dubey, Weigel et al., 1995 ; Frenkel et al., 1995).

### 4.2.2. Eau

Le drainage des sols permet une contamination des eaux de surface et souterraines, des eaux ressources destinées à la consommation et aux loisirs, puis du milieu marin (Bowie et al., 1997 ; Miller et al., 2002). Au regard de la densité des oocystes (1,104-1,140 ; Dubey, Miller et al., 1970b) et de leur interaction probable avec des particules sédimentaires, les oocystes pourraient se localiser plutôt au fond des eaux stagnantes.

Une seule étude a mis en évidence des toxoplasmes (sous forme d'ADN) dans 10/139 échantillons d'eaux de consommation, de surface ou souterraines, prélevés en dehors de tout contexte épidémique (Villena et al., 2004).

### 4.2.3. Végétaux

La présence d'oocystes sur les fruits et légumes destinés à la consommation n'a jamais été recherchée. Expérimentalement, les oocystes restent infectants pendant 8 semaines au

contact de baies (framboises, myrtilles) conservées à 4°C (Kniel et al., 2002). Ces fruits ainsi que d'autres végétaux peuvent être une source d'infection par *Cyclospora cayetanensis*, coccidie proche du toxoplasme (revu par Shields et Olson, 2003). Il est probable que des oocystes adhérant aux végétaux restent infectants aussi longtemps que les conditions de température et d'humidité optimales pour leur survie sont maintenues. Leur ingestion par un hôte est alors possible avant la décomposition des végétaux. Des oocystes de toxoplasme ont été isolés par bio-essai sur de la nourriture de porc (Dubey, Weigel et al, 1995).

### 4.3. Exemples d'espèces animales soumises à l'infection par les oocystes

Un seul oocyste peut induire une toxoplasmose chez la souris (Dubey, Speer et al., 1997) ou chez le porc (Dubey, Lunney et al., 1996), mais certaines espèces y sont plus résistantes : chat, rat, bovins (Dubey et Beattie, 1988 ; Dubey, 1996a ; 1996b). L'ingestion d'oocystes est un mode majeur de contamination pour un grand nombre de mammifères et d'oiseaux (Tenter et al., 2000). Il est impossible de faire une présentation exhaustive du réservoir animal soumis à l'infection par les oocystes. Les quatre exemples suivants montrent que certaines espèces, de par leur écologie, peuvent servir de bio-indicateurs de la présence d'oocystes infectants dans l'eau et le sol.

#### 4.3.1. Rongeurs

Les rongeurs ne semblent réellement constituer un réservoir important d'infection pour le chat domestique que dans les zones urbaines ou rurales pour lesquelles un cycle parasitaire perdure (Eyles et al., 1959 ; Dubey, Weigel et al., 1995 ; Frenkel et al., 1995 ; Lehmann et al., 2003). Les données de séroprévalence montre que la contamination des rongeurs dépend fortement du degré d'exposition aux oocystes. L'exposition est maximale près des bâtiments de fermes qui attirent rongeurs et chats (Lehmann et al., 2003). Cependant, cette exposition ne serait pas nécessaire pour maintenir une prévalence élevée. Celle-ci s'expliquerait par une transmission verticale du parasite sur plusieurs générations (Owen et Trees, 1998 ; Marshall et al., 2004). Cette hypothèse nécessite des investigations supplémentaires, pour expliquer l'importance de ce mode de transmission dans la toxoplasmose.



#### 4.3.2. Oiseaux

Par le phénomène de migration, les oiseaux sont aptes à transmettre le toxoplasme sur des distances géographiques importantes, même si la prévalence du parasite chez les espèces migratrices reste peu connue (Dubey, 2002b).

Les espèces sédentaires qui ont été domestiquées (volailles) sont utilisées comme bio-indicateurs d'une contamination tellurique par les oocystes, surtout dans les pays où les conditions climatiques sont très favorables à la survie des oocystes (Da Silva et al., 2003). Des séroprévalences élevées ont été rapportées dans des élevages traditionnels au Brésil (39 à 65,2% selon les régions) (Dubey, Graham et al., 2002, Dubey, Graham et al., 2003a, Dubey, Navarro et al., 2003 ; Da Silva et al., 2003), dans le nord de l'Argentine (65,5% ; Dubey, Venturini et al., 2003), en Israël (42,2% ; Dubey, Salant et al., 2004), en Égypte (40,4% ; Dubey, Graham et al., 2003b) et en République Démocratique du Congo (50,0% ; Dubey, Karhemere et al., 2005). Au contraire, 6,2% et 16,9% de poulets séropositifs sont rencontrés respectivement au Mexique (Dubey, Morales et al., 2004) et aux Etats-Unis (Dubey, Graham et al., 2003c). La séroprévalence en France n'est pas connue.

La fréquence de la contamination de la volaille domestique pourrait représenter un risque potentiel pour l'homme. Cependant, les kystes sont localisés préférentiellement dans le cœur et le cerveau, puis dans les viscères et dans les muscles (Biancifiori et al., 1986 ; Dubey, Ruff et al., 1993 ; Kaneto et al., 1997, Sedlak et al., 2004).

#### 4.3.3. Ovins

Le rôle épidémiologique des ovins est important dans la transmission du parasite à l'homme car ils sont les animaux de boucherie les plus infectés (Tenter et al., 2000).

Les données disponibles sont surtout sérologiques. La séroprévalence varie de moins de 5% au Zimbabwe, Pakistan et en Croatie, à plus de 80% en Turquie et en France (revue par Tenter et al., 2000). En France, huit enquêtes ont été réalisées dans différentes régions entre 1960 et 1997 (tableau 2). Les séroprévalences sont comprises entre 15 et 92%.

Région	Technique <sup>a</sup>	Nombre	Séroprévalence (%)	Référence
Alsace	IFA	180	31	Callot et al., 1970
Anjou	IHA	60	15	Chabasse et al., 1978
Bretagne	IHA	609	36	Doby et Deunff, 1984
Côte d'Or	IFA	583	72	Campana-Rouget et al., 1975
Limousin	DT	120	36	Pestre et al., 1962
Paris	DT	165	72	Guillot et Desmonts, 1960
Vendée	IHA	236	22	Himy-Dahan et al., 1980
Aquitaine	IFA	642	92	Cabannes et al., 1997

**Tableau 2 : Séroprévalence de la toxoplasmose chez le mouton en France.** <sup>a</sup>IFA, immunofluorescence; DT, dye test ; IHA, hémagglutination indirecte.

Responsable de la contamination horizontale, un chat infecté déféquant dans 10 tonnes de céréales peut y déposer plusieurs doses infectantes d'oocystes par kilogramme de grain (McColgan et al., 1988). La présence journalière de chatons dans les bergeries est un facteur de risque important de contamination (Skjerve et al., 1998). L'élevage extensif et un broutage ras qui favorisent l'ingestion d'oocystes, expliquent également des prévalences élevées (Tenter et al., 2000). Une transmission verticale brebis/agneaux sur plusieurs générations pourrait maintenir une prévalence élevée en dehors de l'intervention du chat (Duncanson et al. (2001). Cette hypothèse n'est pas encore vérifiée.

La gravité de la toxoplasmose congénitale dépend de la période de contamination au cours de la gestation (d'une durée totale de 150 j). Parmi les agneaux infectés non viables, 35% meurent avant le terme, 60% à la naissance et 5% quelques jours après (Dubey et Beattie, 1988). Les contaminations tardives donnent des agneaux infectés mais viables. Le cerveau et le placenta sont les organes les plus parasités (Dubey et Beattie, 1988 ; Owen et Trees, 1999 ; Duncanson et al., 2001 ; Hurtado et al., 2001). Habituellement, il n'y a pas de manifestations cliniques chez les brebis, l'éleveur n'est pas alarmé et les avortons sont rarement soumis à une recherche diagnostique. En Suisse, 19% des avortements constatés dans la région de Zurich entre 1996 et 1998 sont dus au toxoplasme qui représente la seconde

étiologie après la chlamydie (Chanton-Greutmann et al., 2002). Ce pourcentage est de 11% en Sardaigne (Masala et al., 2003) et atteint 23% en Espagne (Pereira-Bueno et al., 2004). Une incidence globale de 12% a été retenue par Dubey et Beattie (1988). La toxoplasmose congénitale ovine peut ainsi entraîner des pertes économiques importantes pour les éleveurs (Freyre et al., 1997).

La prévalence parasitaire chez les animaux destinés à la consommation est peu connue. Des données anciennes montrent une prévalence de 2,8% à 67,6% dans différents pays (Dubey et Beattie, 1988). Elle peut varier selon les méthodes utilisées, l'inoculation à la souris pouvant être supérieure aux techniques de biologie moléculaire (Vieira da Silva et Langoni, 2001). Les chances d'isoler le parasite augmentent généralement pour des titres élevés en anticorps (Dubey et Beattie, 1988). Les organes les plus parasités sont le cerveau, le cœur, le diaphragme et les muscles squelettiques (Dubey et Sharma, 1980 ; Dubey et Beattie, 1988 ; Esteban-Redondo et Innes, 1998, Esteban-Redondo et al., 1999). Deux études récentes ont évalué par PCR la prévalence du toxoplasme dans de la viande d'agneau : 6/9 prélèvements sont trouvés positifs par Aspinall et al. (2002) en Angleterre alors que seulement 9/150 sont positifs dans la région de Berne par la même technique (Wyss et al., 2000).

En France, l'importance de la toxoplasmose ovine demande une réévaluation notamment pour déterminer les facteurs de risque liés à la consommation d'animaux infectés.

#### 4.3.4. Mammifères marins

Des séroprévalences élevées et des cas de toxoplasmoses sévères ont été rapportés chez plusieurs espèces de mammifères marins (revus par Dubey et Beattie, 1988 ; Dubey, Zarnke et al., 2003 ; Fayer et al., 2004) notamment chez les loutres de mer (Cole et al., 2000 ; Miller et al., 2002 ; 2004). La prédation sur d'autres homéothermes étant restreinte à quelques espèces, les principaux modes de contamination sont l'ingestion d'oocystes avec l'eau de mer et la prédation sur des mollusques qui concentrent les oocystes dans leurs tissus et peuvent servir d'hôtes paraténiques au parasite (Fayer et al., 2004). Expérimentalement, les huîtres et les moules immergées dans l'eau de mer retiennent des oocystes infectants pendant 85 j (Lindsay, Phelps et al., 2001 ; Lindsay, Collins et al., 2004b ; Arkush et al., 2003). Ces mollusques, et peut-être d'autres, sont potentiellement des sources d'infection toxoplasmique

pour les animaux et pour l'homme de la même façon que les oocystes de *Cryptosporidium parvum* (Fayer et al., 1998 ; Freire-Santos et al., 2000b). Le lessivage des sols côtiers et les effluents continentaux sont les portes d'entrée des oocystes dans le milieu marin (Miller et al., 2002). La salinité a peu d'effets sur l'infectiosité des oocystes (Lindsay, Collins et al., 2003).

#### 4.4. Le rôle des oocystes dans l'infection humaine

En l'absence d'un sérodiagnostic différentiel, il est impossible de déterminer quel stade évolutif est à l'origine d'une toxoplasmose. La part des oocystes est donc inconnue même s'il existe des évidences épidémiologiques de toxoplasmose due à l'ingestion d'oocystes.

##### 4.4.1. Facteurs de risque associés aux oocystes

Les facteurs de risque associés aux oocystes diffèrent selon les études. Le degré d'exposition aux oocystes varie en fonction des zones géographiques, du climat qui assure la plus ou moins grande survie des oocystes dans le sol, des habitudes culinaires et d'autres facteurs intervenant dans le mode de vie. Malgré des résultats hétérogènes, les principaux facteurs de risque sont le contact avec le sol (jardinage sans gants) (Baril et al., 1999 ; Weigel et al., 1999 ; Cook et al., 2000) et la consommation fréquente de crudités par des femmes qui ne les avaient pas préparés elles-mêmes (Baril et al., 1999). La consommation d'eau non traitée est un facteur de risque dans des pays où le traitement de l'eau est peu développé (comme dans certaines régions du Brésil) (Bahia-Oliveira et al., 2003). Des cas de toxoplasmoses chez des végétariens laissent penser à l'ingestion de végétaux contaminés (Hall et al., 1999 ; Roghmann et al., 1999 ; Carme et al., 2002). La proximité des chats n'est pas toujours retenue comme facteur de risque (Cook et al., 2000 ; Bahia-Oliveira et al., 2003).

De façon indirecte, les oocystes constituent également un risque par la contamination des animaux de boucherie.

#### 4.4.2. Épidémies et cas groupés de toxoplasmoses par ingestion d'oocystes

Plusieurs épidémies et cas groupés de toxoplasmoses par ingestion d'oocystes ont montré que la dissémination du parasite à partir de quelques félins excréteurs était assez efficace pour infecter un nombre significatif d'individus (tableau 3). Ceci est d'autant plus vrai pour les épidémies hydriques, au cours desquelles de faibles volumes d'eau peuvent être vecteurs de plusieurs doses infectantes d'oocystes. A l'opposé, une contamination tellurique est plutôt à l'origine de petites épidémies souvent familiales.

Dans la plupart des épidémies documentées, les adénopathies sont les principales manifestations cliniques observées. Des formes plus sévères ont été observées chez des sujets immunocompétents au Canada (Bowie et al., 1997), au Brésil (Taverne, 2002) et au Surinam (Demar et al., 2005). Les cas mortels sont exceptionnels (Demar et al., 2005).

A part deux études ayant associé la présence d'oocystes de toxoplasme à des cas groupés de toxoplasmoses (tableau 3), les sources de contamination restent difficile à identifier.

Les enquêtes épidémiologiques montrent toujours la présence de chats ou de félins sauvages au moment de la contamination. L'épidémie canadienne est de loin la plus documentée car elle est la première à avoir été associée à l'ingestion d'eau de boisson contaminée par le toxoplasme (Bowie et al., 1997 ; Isaac-Renton et al., 1998 ; Aramini et al., 1998 ; 1999). Deux paramètres semblent avoir favorisé cette épidémie : (i) la contamination d'un des deux réservoirs alimentant la région de Victoria par des oocystes émis par les chats et cougars endémiques (Aramini et al., 1998 ; 1999), et (ii) le traitement de l'eau par chloration qui a eu peu d'effet sur l'infectiosité des oocystes (Bowie et al., 1997 ; Isaac-Renton et al., 1998). L'absence d'un traitement approprié de l'eau de boisson serait également à l'origine de deux épidémies de toxoplasmose dans la ville de Santa Isabela do Ivaí (Paraná, Brésil) (Taverne, 2002 ; Dubey, Navarro et al., 2004 ; Holland, 2003), et dans un village surinamien (Demar et al., 2005).

Pays	Année	Source de Contamination	Nombre de cas	Expression clinique	Oocystes isolés	Référence
Royaume-Uni	1972	Bac à sable	2 (familiaux)	1 forme symptomatique 1 forme asymptomatique (sérologie évolutive)	Oui <sup>b</sup>	Fleck et al., 1972
USA	1976	Sol	10 (familiaux)	7 formes symptomatiques aiguës (dont une atteinte neurologique sévère) 3 formes asymptomatiques (sérologie évolutive)	Non	Stagno et al., 1980
USA	1977	Poussière Ingérée	37	35 formes symptomatiques aiguës 2 formes asymptomatiques	Non	Teutsch et al., 1979
USA	1979	Contact avec des chatons infectés	9 (familiaux)	6 symptomatiques aiguës 3 formes asymptomatiques	Non	Shenep et al., 1984
<b>Panama</b>	<b>1979</b>	<b>Eau de surface</b>	<b>35</b>	<b>32 formes symptomatiques aiguës</b> <b>3 formes asymptomatiques</b>	<b>Non</b>	<b>Benenson et al., 1982</b>
Brésil	1982	Sol	NS <sup>a</sup>	NS	Oui <sup>b</sup>	Coutinho et al., 1982
<b>Canada</b>	<b>1995</b>	<b>Eau de boisson</b>	<b>100</b> <b>(2894-7718 estimés)</b>	<b>63 formes symptomatiques aiguës</b> <b>(dont 19 chorioretinites)</b> <b>37 femmes enceintes asymptomatiques</b> <b>2 formes asymptomatiques</b>	<b>Non</b>	<b>Bowie et al., 1997</b>
<b>Brésil</b>	<b>2002</b>	<b>Eau de boisson</b>	<b>290</b>	NS	<b>Non</b>	<b>Taverne, 2002</b>
<b>Surinam</b>	<b>2005</b>	<b>Eau de boisson</b>	<b>11</b>	<b>9 formes symptomatiques aiguës</b> <b>2 formes congénitales</b>	<b>Non</b>	<b>Demar et al., 2005</b>

**Tableau 3 : Épidémies et cas groupés de toxoplasmoses par ingestion d'oocystes** (en gras, les cas d'origine hydrique). <sup>a</sup> NS, non spécifié. <sup>b</sup>

Oocystes isolés par inoculation à la souris d'échantillons de sol ou d'eau.

## 4.5. Association avec des génotypes particuliers

### 4.5.1. Diversité génétique du toxoplasme : outils d'analyse et biais de sélection

Cette diversité peut être analysée par plusieurs techniques de typage faisant appel à des marqueurs phénotypiques ou génotypiques : analyse de l'expression d'iso-enzymes (Dardé et al., 1992), PCR-RFLP d'un ou plusieurs gènes codant pour des antigènes du parasite (ex : *SAG2*, codant pour un antigène de surface du tachyzoïte) (Howe et Sibley, 1995), analyse de microsatellites polymorphes présents dans le génome du toxoplasme (Blackston et al., 2001 ; Ajzenberg et al., 2002a ; 2005). Un typage génétique est d'autant plus informatif que les marqueurs utilisés sont suffisamment polymorphes et leur nombre important. La combinaison de plusieurs marqueurs (typage multilocus) permet ainsi de détecter des recombinaisons alléliques, qui ne sont pas révélées avec un seul marqueur (typage unilocus).

Les isolats connus de toxoplasme proviennent essentiellement d'Europe et des Etats-Unis, de toxoplasmoses humaines ou d'animaux domestiques. Ces isolats ne reflètent donc pas du tout la diversité zoologique et géographique des hôtes du parasite. La sélection des isolats en fonction du type de toxoplasmose introduit un biais supplémentaire. Le parasite est habituellement isolé au cours de toxoplasmoses symptomatiques alors que les formes asymptomatiques sont prépondérantes dans la maladie.

### 4.5.2. Structure génétique de *T. gondii*

Les analyses multilocus sur des isolats nord-américains ou européens montrent que 95% des isolats connus appartiennent à 3 génotypes dits « classiques » (I, II, et III) (Dardé et al., 1992 ; Howe et Sibley, 1995 ; Ajzenberg et al., 2002a). Ils sont considérés comme trois lignées clonales qui seraient apparues il y a 10 000 ans avec la domestication animale (Su et al., 2003). Les génotypes recombinants (combinaison des allèles classiques : I/II, I/III, II/III, I/II/III) et les génotypes atypiques (combinaison partielle ou totale d'allèles non I, II ou III) représentent les 5% restants (Ajzenberg et al., 2004). Les principales caractéristiques biologiques et épidémiologiques des génotypes de toxoplasme sont résumées dans le tableau 4.

---

**Type I**

Rarement isolé (10% des collections d'isolats)

Origine principalement humaine

Europe, Etats-Unis, Amérique du Sud

*Comportement in vivo* : virulence importante chez la souris (DL100<10 tachyzoïtes)

*Comportement in vitro* : fort taux de multiplication,

interconversion tachyzoïte ↔ bradyzoïte réduite

**Type II**

80% des collections d'isolats

Origine humaine et animale (domestique et sauvage)

Europe, Etats-Unis

*Comportement in vivo* : avirulence, infection chronique

chez la souris avec persistance de kystes tissulaires

*Comportement in vitro* : faible taux de multiplication,

interconversion tachyzoïte-bradyzoïte

avec formation de kystes en culture cellulaire

**Type III, génotypes recombinants et génotypes atypiques**

Rarement isolé

Origine humaine (association avec des toxoplasmoses souvent sévères)

Origine animale (hôtes sauvages inhabituels)

Zones géographiques peu étudiées (régions intertropicales +++)

*Comportement in vivo* : virulence intermédiaire entre types I et II

*Comportement in vitro* : peu étudié

---

**Tableau 4 : Principales caractéristiques biologiques et épidémiologiques des génotypes de *T. gondii* (d'après Dardé, 2004).**



### 4.5.3. Quels génotypes circulent dans l'environnement ?

#### ***Type I***

Les isolats d'origine animale, identifiés comme type I par typage multilocus, sont peu nombreux. Les isolats CT-1 et GT-1, respectivement d'origine bovine et caprine, démontrent la circulation d'oocystes de type I dans l'environnement (Dubey, 1980 ; Dubey, 1992).

La découverte récente d'une forte proportion de « type I » après typage unilocus (PCR-RFLP *SAG2*) d'isolats de mouton (Fuentes et al., 2004), de poulet (Dubey, Graham et al., 2002 ; Dubey, Graham, et al., 2003a ; Dubey, Navarro, et al. 2003 ; Dubey, Venturini, et al., 2003 ; Dubey, Lévy et al., 2004 ; Dubey, Morales, et al., 2004 ; Dubey, Karhemere et al., 2005) et dans des produits de boucherie (Aspinall et al., 2002) demande à être confirmée par des études multilocus.

#### ***Types II et III***

Ces deux types sont majoritaires en Europe et aux États-Unis chez les animaux domestiques et sauvages : félins (Jungersen et al., 2002 ; Dubey, Navarro et al., 2004 ; Dubey, Graham et al., 2004 ; Montoya et al., 2004), animaux de boucherie (ovins, porcins et poulets) (Howe et Sibley, 1995 ; Mondragon et al., 1998 ; Owen et Trees 1999 ; Jungersen et al., 2002 ; Lehmann et al., 2003 ; Dubey, Graham et al., 2003c ; Dubey, Edelhofer et al., 2005) et gibier (Dubey, Graham et al., 2004 ; Villena I, communication personnelle).

#### ***Types recombinants ou atypiques***

Les génotypes recombinants ou atypiques proviennent essentiellement de régions faiblement anthropisées, peu étudiées jusqu'à présent (zone intertropicale en particulier), et/ou sont isolés d'hôtes inhabituels asymptomatiques (animaux sauvages) : loutre de mer (Cole et al., 2000 ; Miller et al., 2004), ours et cerf (Howe et Sibley, 1995). Chez l'homme, de tels génotypes ont toujours été associés à des toxoplasmoses symptomatiques sévères (Bossi et al., 1998 ; Dardé et al., 1998 ; Grigg et al., 2001 ; Carme et al., 2002 ; Ghosn et al., 2003 ; Ajzenberg et al., 2004 ; Demar et al., 2005). En conditions naturelles, un génotype recombinant ou atypique a été isolé à partir d'oocystes émis par un cougar vivant dans la région de Victoria, un an après la survenue d'une épidémie de toxoplasmoses aiguës dans la même région (Aramini et al., 1998 ; 1999 ; Lehmann et al., 2000).

Ces génotypes recombinants ou atypiques semblent donc circuler dans des cycles parasites où l'homme intervient rarement et de façon accidentelle. A l'intérieur de ces cycles sauvages, les échanges sexués pourraient prédominer sur une transmission clonale des trois génotypes classiques. Au contraire, il semble que les génotypes I, II et III, bien adaptés à un cycle entre l'homme et les animaux domestiques, se soient propagés de manière clonale (Ajzenberg et al., 2004 ; Lehmann et al., 2004).

***En conclusion, les types II et III sont prépondérants dans les réservoirs du parasite. Ceci n'est vérifié qu'en Europe et aux Etats-Unis, surtout pour les animaux domestiques. L'analyse d'isolats provenant d'animaux sauvages et de zones géographiques peu étudiées jusqu'à présent permettrait de redéfinir la prévalence de chaque génotype.***

## 5. Méthodes de détection des oocystes

### 5.1. Stratégies d'échantillonnage

La recherche d'oocystes dans un lieu donné est soumise à trois critères principaux: (i) la présence d'un nombre suffisant de chats pour y maintenir un cycle parasitaire avec leurs proies, (ii) des conditions climatiques favorisant la persistance d'oocystes infectants, (iii) l'accessibilité des hôtes intermédiaires aux matrices contaminées.

En milieu rural, les lieux rassemblant ces critères sont les réserves d'aliments qui attirent rongeurs et chats dans les bâtiments d'élevage. Elles ont été retenues comme source d'infection dans des élevages porcins aux États-Unis (Dubey, Weigel et al., 1995). Les oocystes sont également à rechercher autour des bâtiments d'élevage et des habitations (potagers), près des points d'eau, dans les prairies humides exposées au drainage des sols, dans les fossés. En milieu urbain, les jardins publics (aires de jeux) et particuliers (potagers), et d'une façon générale les lieux ombragés aux sols meubles et humides semblent propices. La filtration d'eaux de surface stagnantes est préférable à celle d'eaux courantes. Des recherches ponctuelles dans l'eau potable sont possibles en fonction du type de traitement et de l'état d'entretien du réseau de distribution.

Il ne doit pas exister dans la plupart des cas de saisonnalité marquée pour la détection des oocystes dans les eaux car les chats peuvent s'infecter tout au long de l'année et les oocystes sont assez résistants aux variations climatiques annuelles. Néanmoins, les périodes de fortes précipitations qui entraînent un lessivage des sols souillés ont déjà été associées à des cas de toxoplasmose chez l'homme ou l'animal (Bowie et al., 1997 ; Miller et al., 2002).

Une source de contamination est rarement identifiée en dehors de tout contexte épidémique. Après une épidémie, la recherche des oocystes doit être rapide, car ils peuvent disparaître de la source de contamination pendant le délai d'apparition des premiers signes cliniques (Teutsch et al., 1979 ; Stagno et al., 1980 ; Shenep et al., 1984 ; Isaac-Renton et al., 1998).

## 5.2. Détection dans l'eau

Les méthodes de recherche du toxoplasme dans l'eau ressemblent à celles développées pour les oocystes de *Cryptosporidium parvum* et les kystes de *Giardia intestinalis* (Zarlenga et Trout, 2004). Étant donné une plus faible densité des toxoplasmes dans un échantillon pris aléatoirement, l'analyse devrait porter, si possible, sur un volume d'eau important (50 à 100 L).

### 5.2.1. Concentration

Trois méthodes sont utilisées selon le volume d'eau à concentrer : la filtration, la floculation et la centrifugation.

#### 5.2.1.1. Filtration

Isaac-Renton et al. (1998) et Villena et al. (2004) ont évalué des cartouches, respectivement en acrylique tissé et en polyéthersulfone (Gelman Envirochek Standard (GES) ou High-Volume (GEHV)), qui permettent la filtration de volumes plus importants (500-1000 L) et plus turbides que des membranes classiques, en cellulose ou en polycarbonate. Les GES et GEHV sont maintenant recommandées pour la détection normalisée de *C. parvum* et de *G. intestinalis* (AFNOR, 2001 ; USEPA, 2001) car elles ont une capacité de filtration importante, et leur conception facilite l'élution des protozoaires, en toute sécurité (McCuin et Clancy, 2003 ; Wohlsen et al., 2004). Leur porosité d'1 µm permet la capture des oocystes de toxoplasme avec une sensibilité théorique de 1 à 10 oocystes / litre d'eau distillée pour 100 L filtrés (Villena et al., 2004 et Villena, 2004). Ces auteurs ont montré que la sensibilité diminue quand la turbidité (exprimée en NTU) augmente, sans savoir si cela est dû à la filtration ou aux étapes ultérieures d'élution, de purification ou de mise en évidence des oocystes (Villena et al., 2004). Une diminution similaire des pourcentages de récupération des oocystes de cryptosporidies et des kystes de *Giardia* peut être corrélée à la turbidité. La perte des protozoaires a lieu surtout pendant les étapes de filtration et d'élution : 40 à 50% dans des eaux peu turbides (11 NTU) et jusqu'à 99% pour les *Giardia* à 99 NTU alors que 35% des cryptosporidies sont encore récupérés à cette turbidité (DiGiorgio et al., 2002). Dans une autre étude, Simmons et al. (2001) montrent une perte moyenne de cryptosporidies plus importante encore (85%) dans des eaux de surface d'une turbidité moyenne de 14,9 NTU.

L'éluion des oocystes est une étape importante et son efficacité dépend de la turbidité du prélèvement, du type de filtre et de la méthode choisie (Musial et al., 1987 ; LeChevallier et al., 1995 ; Nieminski et al., 1995 ; Inoue et al., 2003). Les oocystes piégés par le filtre sont élués avec des solutions détergentes qui rompent les interactions hydrophobes entre les oocystes, les particules sédimentaires et les fibres du filtre (Musial et al., 1987). La sonication du culot après centrifugation de l'éluat semble améliorer la séparation des oocystes de cryptosporidies (Musial et al., 1987). La normalisation des procédés a conduit à l'utilisation de solutions salines types PBS supplémentées en détergents comme le laureth-12 ou le Tween-80 (AFNOR, 2001 ; USEPA, 2001). Malgré leur caractère dispersant, la force ionique relativement élevée du PBS (164 mM) entraîne plutôt l'agrégation des oocystes aux débris (Davies et al., 2003). L'utilisation de solutions contenant des agents dispersants (EDTA, pyrophosphate de sodium) augmente significativement le pourcentage moyen de récupération des oocystes de cryptosporidies par rapport aux solutions conventionnelles (Inoue et al., 2003).

Une seule étude a évalué les méthodes d'éluion USEPA et AFNOR sur les oocystes de toxoplasme (Villena, 2004). Il n'a pas été observé de différences entre les deux procédures pour un même type de prélèvements (eau distillée, eau de consommation et eau de surface). Il est à noter qu'aucun oocyste n'a été détecté dans des prélèvements turbides, sans que cet échec soit dû spécifiquement à l'éluion.

#### 5.2.1.2. Flocculation

La flocculation est employée dans les stations de potabilisation des eaux pour clarifier les eaux turbides. Appliqué au toxoplasme, cette technique simple et peu coûteuse entraîne à pH acide (5,4 à 6,0) la flocculation des particules solides et des oocystes par des agents tels que le sulfate de fer ( $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ ) ou le sulfate d'aluminium ( $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ ). Le surnageant éliminé, le floc est dissout (pH 4,0) et les oocystes sont concentrés par centrifugation (Kourenti et al., 2003). Il n'existe pas de différence significative entre les deux types de flocculation dans la récupération d'oocystes de toxoplasme sporulés ou non à partir d'1 L d'eau distillée. Les pourcentages moyens de récupération sont compris entre  $90,4\% \pm 19,1\%$  et  $100,3\% \pm 26,9\%$ . Ces valeurs peuvent diminuer jusqu'à  $35,9\% \pm 12,3\%$  selon l'inoculum et l'âge des oocystes, quelque soit l'agent utilisé.

Cette technique est difficilement applicable au traitement de volumes importants. Si ses effets sur la viabilité des oocystes de toxoplasme ne sont pas connus, la floculation peut diminuer celle des oocystes de cryptosporidies (Shepherd et Wyn-Jones, 1996). La floculation semble moins efficace que la filtration pour éliminer les inhibiteurs de PCR (Monis et Saint, 2001), comme les ions  $Fe^{3+}$  (Kourenti et Karanis, 2004).

### 5.2.1.3. Centrifugation

Cette technique a permis à Dubey, Weigel et al. (1995) d'analyser des prélèvements de faible volume effectués dans plusieurs fermes porcines américaines. Expérimentalement, la centrifugation a été évaluée sur un volume maximal d'1 L d'eau non turbideensemencé avec  $10^5$  ou  $10^4$  oocystes conservés pendant 2 à 21 mois, à des vitesses comprises entre 1040 et 2889 g (Kourenti et al., 2003). Globalement, le pourcentage de récupération augmente avec la vitesse de centrifugation et avec l'âge des oocystes et diminue avec l'inoculum. Cette technique est moins sensible que la floculation et ne permet pas le traitement de plusieurs dizaines de litres (Kourenti et al., 2003).

## 5.2.2. Purification

### 5.2.2.1. Flottation

Avec une densité minimale de 1,15, les solutions de saccharose et de Percoll-saccharose sont utilisées pour purifier les oocystes de toxoplasme qui ont une densité de 1,104-1,140 (Dubey, Miller et al., 1970b ; Dubey, Weigel et al., 1995 ; Isaac-Renton et al., 1998 ; Villena et al., 2004). Leur inconvénient majeur est leur faible spécificité puisque certains débris (végétaux notamment) sont co-extraits avec les oocystes particulièrement à des fortes densités (1,28-1,30) (LeChevallier et al., 1995 ; Villena, 2004). D'autre part, des oocystes pourraient échapper à la purification en raison d'une augmentation de leur densité par interactions avec les débris (Bukhari et Smith, 1995). A défaut de méthodes plus spécifiques, la flottation est simple et peu coûteuse mais elle doit être couplée à un bio-essai et/ou à une détection par biologie moléculaire car elle ne permet pas la distinction microscopique entre *Toxoplasma gondii* et les coccidies proches du genre *Hammondia* et *Neospora*.

### 5.2.2.2. Séparation immunomagnétique (IMS)

Le principe de la séparation immunomagnétique (IMS) repose sur la capture d'une cellule-cible par des billes magnétiques recouvertes d'anticorps spécifiques, suivie de sa séparation des débris environnants à l'aide d'un dispositif magnétique (Safarik et Safarikova, 1999). L'IMS permet la purification de nombreux types cellulaires et la détection de microorganismes pathogènes dans la nourriture et l'eau. Les kystes de *G. intestinalis*, les oocystes de *C. parvum*, et dans une moindre mesure ceux de *C. cayetanensis* bénéficient de protocoles d'IMS (Robertson et al., 2000 ; USEPA, 2001).

**Un point important est l'absence d'IMS pour les oocystes de toxoplasme due à l'absence d'anticorps monoclonaux dirigés contre la paroi des oocystes.**

De nombreux travaux ont démontré la supériorité de l'IMS sur les techniques de flottation à partir d'échantillons peu turbides (revus par Quintero-Betancourt et al., 2002 et Zarlenga et Trout, 2004). Les pourcentages de récupération des oocystes de cryptosporidies et des kystes de *Giardia* peuvent être très élevés (jusqu'à 100%) et semblent indépendants de l'âge des organismes (Bukhari et al., 1998 ; Rochelle et al., 1999 ; McCuin et al., 2001). Cependant, plusieurs facteurs diminuent la sensibilité de l'IMS : la teneur des échantillons en fer dissout (Yakub et Stadterman-Knauer, 2000), le pH (Kuhn et al., 2002) et la quantité de débris que l'on peut relier à la turbidité (Di Giovanni et al., 1999). Ces derniers auteurs ont évalué le rendement de l'IMS après filtration. Ils ont obtenu des pourcentages de récupération de 9 à 26% dans des eaux de surface. Les interactions oocystes-débris diminuent les possibilités de reconnaissance des oocystes par les billes magnétiques recouvertes d'anticorps monoclonaux.

### 5.2.2.3. Cytométrie en flux

La cytométrie en flux nécessite également des anticorps monoclonaux. Elle permet de compter avec précision de faibles quantités d'oocystes de cryptosporidies dans l'eau (Quintero-Betancourt et al., 2002). Sa sensibilité dépend du bruit de fond parfois important dû à la fixation non spécifique d'un anticorps aux débris ou à l'autofluorescence de ces derniers. Appliquée au toxoplasme, cette difficulté pourrait être surmontée en triant les oocystes en fonction de leur taille et de leur autofluorescence caractéristique, comme cela a été montré pour *Cyclospora cayetanensis* (Varma et al., 2003).

### 5.2.3. Détection

#### 5.2.3.1. Microscopie

La microscopie optique est suffisante pour l'examen de prélèvements très contaminés comme des fèces de chats. L'autofluorescence facilite la détection des oocystes au milieu des débris mais ne permet pas de distinguer *Toxoplasma gondii* d'*Hammondia hammondi*. Dans des prélèvements hydriques aléatoires, la confusion peut s'étendre à *Hammondia heydorni* et aux espèces du genre *Neospora*. De plus, certains oocystes ne fluorescent pas et peuvent conduire à une fausse négativité (Dumètre et Dardé, 2003). L'utilisation d'anticorps monoclonaux spécifiques d'espèce est envisageable dans un test d'immunofluorescence, non utilisé jusqu'à présent pour les oocystes de toxoplasme.

#### 5.2.3.2. Analyse moléculaire

Le toxoplasme est souvent mis en évidence dans les liquides biologiques et les tissus par amplification du gène B1 par PCR. La détection d'oocystes par PCR est plus aléatoire en raison (i) de la résistance de la paroi aux méthodes habituelles d'extraction d'ADN et (ii) de la présence d'inhibiteurs de l'ADN polymérase dans les échantillons à analyser.

(i) les méthodes d'extraction d'ADN des oocystes de coccidies reposent surtout sur une fragilisation physique ou chimique de la paroi. Les traitements physiques sont généralement la sonication, l'alternance congélation/décongélation et l'agitation des oocystes avec des billes de verre (Wiedenmann et al., 1998). Les traitements chimiques consistent à incuber les oocystes dans des solutions enzymatiques (protéinase K ou milieux conventionnels pour le dékystement des sporozoïtes) ou avec des composés qui perturbent l'intégrité des parois (hypochlorite de sodium, cetyl trimethyl ammonium bromide ou CTAB) (Zhao et al., 2001). Cependant, il n'existe pas de méthode standard et plusieurs traitements sont généralement combinés. Cette première étape, obligatoire, est suivie par un temps d'extraction et de purification de l'ADN, par des méthodes classiques (Wiedenmann et al., 1998).

(ii) des substances solubles telles que les acides humiques, les polysaccharides et les phénols, ainsi que certains ions sont les principaux inhibiteurs de PCR rencontrés dans les matrices environnementales (Sluter et al., 1997 ; Wilson, 1997 ; Frostegard et al., 1999). Une



première partie peut être éliminée par IMS ou par cytométrie en flux (Johnson et al., 1995), une seconde par l'ajout d'agents chélateurs pendant l'extraction d'ADN (Sturbaum et al., 1998 ; Hallier-Soulier et Guillot, 2000 ; Orlandi et al., 2000), une troisième par l'incorporation, dans le milieu réactionnel de PCR, de sérum albumine bovine (BSA) qui empêche l'inactivation de la *Taq* polymérase par les phénols (Kreader, 1996 ; Rochelle et al., 1997 ; Ward et Wang, 2001 ; Villena et al., 2004).

Les travaux de Schwab et McDevitt (2003), Kourenti et Karanis (2004), Villena, 2004 et Villena et al. (2004) ont confirmé une diminution de la sensibilité de la PCR en conditions turbides. Seuls Villena et al. (2004) ont évalué la PCR après toutes les étapes de traitement d'un prélèvement contaminé (de sa filtration à la détection moléculaire). Le seuil de détection de 1 oocyste / L est atteint dans 50-60% des cas en conditions non turbides. En conditions turbides, 1000 oocystes / L sont mis en évidence dans 50% des cas et 100 / L dans 20% des cas.

#### 5.2.3.3. Viabilité et virulence

L'inoculation à la souris reste le seul bio-essai envisageable pour l'étude de la viabilité et de la virulence des oocystes circulant dans l'environnement. Cependant, elle ne donne qu'une idée de l'infectiosité globale de la suspension parasitaire car un seul oocyste vivant peut suffire à infecter une souris. L'infectiosité est pratiquement identique par voie orale et par voie sous cutanée. Elle est supérieure d'un facteur 10 par voie intrapéritonéale pour une dose capable d'infecter environ 50% des souris (DI50) comprise entre 1 et 10 oocystes (soit entre 8 et 80 sporozoïtes) (Dubey et Frenkel, 1973). La virulence dépend surtout de l'inoculum et du génotype des oocystes. Pour des échantillons d'eau surchargés, la sensibilité de l'inoculation à la souris semble varier avec la turbidité des échantillons. Le seuil de 1 oocyste / L est atteint dans 20 à 30% des cas en conditions non turbides alors qu'il est de 1000 / L dans 30% des cas, en conditions turbides (Villena et al., 2004).

D'autres méthodes de mesure de la viabilité sont envisageables : colorations vitales, détection d'ARNm, électrorotation (Dalton et al., 2001). Un aspect microscopique très dégénéré des oocystes (contenu granuleux, absence de distinction des sporozoïtes au sein de l'oocyste) peut être un signe de non-viabilité mais non un élément de certitude. A ce jour, il n'existe pas de colorations vitales applicables au toxoplasme telles qu'elles sont proposées pour les cryptosporidies (Freire-Santos et al., 2000a). Leur application au toxoplasme ne

semble pas évidente en raison des différences marquées dans la structure et la composition des parois de leur oocyste (Dumètre et Dardé, 2003). La détection d'ARNm par RT-PCR a été utilisée pour détecter d'autres protozoaires dans l'eau (Kaucner et Stinear, 1998) mais la sensibilité dépend des protocoles d'extraction d'ARN et de la présence d'inhibiteurs de PCR (Carey et al., 2004).

### 5.3. Détection dans les matrices solides

Les méthodes de concentration hydrique ne sont pas applicables pour traiter des végétaux ou des échantillons de sol. Les techniques décrites reposent sur une homogénéisation mécanique de l'échantillon et une purification par flottation sur saccharose (Fleck et al., 1972 ; Ruiz et al., 1973 ; Frenkel et al., 1975 ; 1995 ; Coutinho et al., 1982 ; Dubey et al., 1995 ; Kniel et al., 2002 ; Matsuo et al., 2004). Les oocystes sont mis en évidence par inoculation à la souris. Des techniques similaires sont utilisées sur les mollusques (Lindsay et al., 2001 ; Lindsay, Collins et al., 2004b ; Arkush et al., 2003).

Trois paramètres, liés entre eux, sont critiques pour la recherche des oocystes dans les matrices solides : la taille de l'échantillon, l'efficacité de la purification et la présence d'inhibiteurs de PCR. La taille de l'échantillon doit être la plus importante possible compte tenu de la faible quantité d'oocystes par gramme de matière, même si ponctuellement des sols ou des végétaux peuvent se retrouver très contaminés par des excréments de chats. La taille des échantillons analysés varie de 1 à 500 grammes pour de la terre (Ruiz et al., 1973 ; Frenkel et al., 1975 ; Coutinho et al., 1982 ; Matsuo et al., 2004) et de 3 à 6 grammes pour des baies (Kniel et al., 2002). L'efficacité de la purification a été évaluée par Matsuo et al. (2004) sur 30 grammes de terreensemencés avec 500 oocystes. L'ajout de gélatine, avant et pendant la flottation fait varier significativement le pourcentage de récupération de 7 à 21%. Il a été montré que l'incorporation d'agents dispersants et de solutions détergentes optimisait la récupération des oocystes de cryptosporidies (Kuczynska et Shelton, 1999 ; Davies et al., 2003 ; Inoue et al., 2003). D'autre part, l'étape de flottation pourrait être améliorée en utilisant d'autres solutions denses que celle de saccharose : Percoll, chlorure de césium, bromure de potassium (Kuczynska et Shelton, 1999 ; Chesnot et Schwartzbrod, 2004). Les inhibiteurs de PCR présents dans le sol (acides humiques surtout) peuvent être levés notamment par l'ajout

de BSA. Une sensibilité de 1 oocyste de toxoplasme / gramme de terre a été obtenue par Matsuo et al. (2004). Les effets inhibiteurs des composés phénoliques présents dans les végétaux peuvent être levés par du lait écrémé (De Boer et al., 1995). L'analyse de végétaux frais est préférable car ils contiennent moins d'inhibiteurs que les végétaux abîmés (Anonyme, 1997).

#### 5.4. Synthèse des méthodes proposées

Sur la base des méthodes qui existent pour détecter les oocystes de *Toxoplasma gondii* et d'autres protozoaires (*Cryptosporidium* sp., *Cyclospora cayetanensis*, *Giardia intestinalis*), nous proposons un schéma de synthèse des méthodes qui pourraient être utilisées couramment pour la détection des oocystes de toxoplasme (figure 6). Certaines d'entre elles ont été développées, évaluées, et appliquées au cours de ce travail de thèse.

# OOCYSTES

Origine : fèces de félinés, Principales caractéristiques : 13x11 µm, autofluorescence sous UV

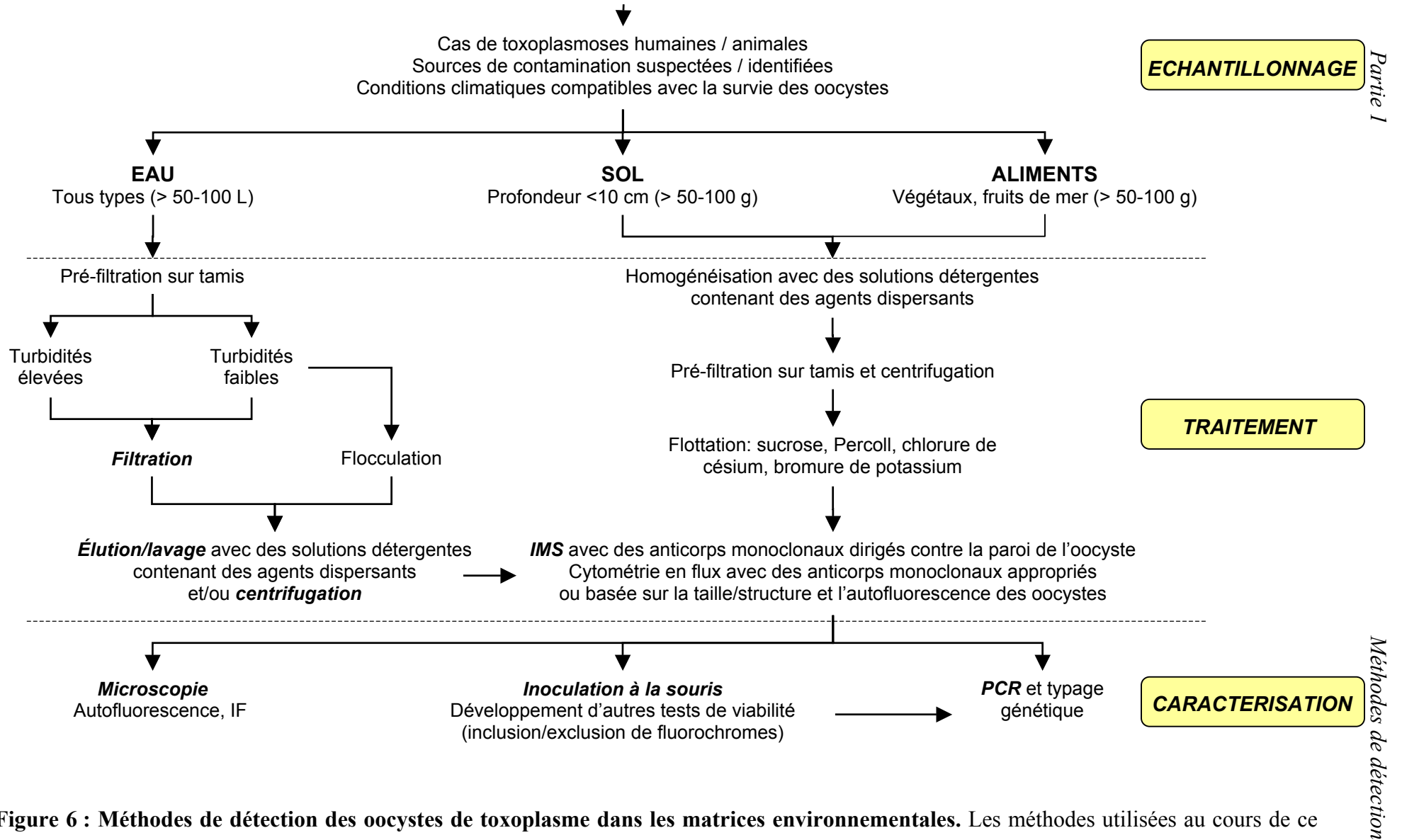


Figure 6 : Méthodes de détection des oocystes de toxoplasme dans les matrices environnementales. Les méthodes utilisées au cours de ce travail apparaissent en gras et en italique.

## 6. Conclusion - Objectifs

Les points importants à retenir concernant le rôle épidémiologique des oocystes dans la toxoplasmose :

- seuls les félins assurent une dissémination primaire des oocystes. Des facteurs biotiques (invertébrés) et abiotiques (eau, sol) permettent une dissémination secondaire. Les hôtes non strictement carnivores sont particulièrement soumis à une contamination par les oocystes.
- les parois de l'oocyste et du sporocyste maintiennent l'infectiosité des sporozoïtes pendant plusieurs mois dans l'environnement. Les bases biochimiques de cette résistance ne sont pas élucidées car la composition et les propriétés de ces parois sont peu étudiées.
- la résistance des oocystes à certains procédés de traitement de l'eau de boisson (chloration) peut être à l'origine d'une contamination d'un nombre significatif d'individus. Les cas groupés de toxoplasmoses humaines par ingestion d'oocystes sont très souvent symptomatiques, indépendamment du statut immunitaire des individus. Leur association avec des génotypes particuliers n'est pas évidente.
- d'une façon générale, les sources de contamination restent mal identifiées, en raison d'un manque de méthodes appropriées pour détecter directement les oocystes dans les matrices environnementales. Des espèces animales peuvent être utilisées comme bio indicatrices de la présence des oocystes dans l'eau ou le sol. Certaines sont consommées par l'homme.
- *au final, il y a un manque de données concernant la prévalence des oocystes dans l'environnement et leur rôle épidémiologique dans la toxoplasmose humaine ou animale.*

**L'objectif de ce travail** est de détecter des toxoplasmes dans des réservoirs soumis à une contamination par les oocystes, et si possible de les comparer génétiquement aux isolats de référence provenant essentiellement de cas humains. Pour cela, deux approches sont proposées (figure 7).

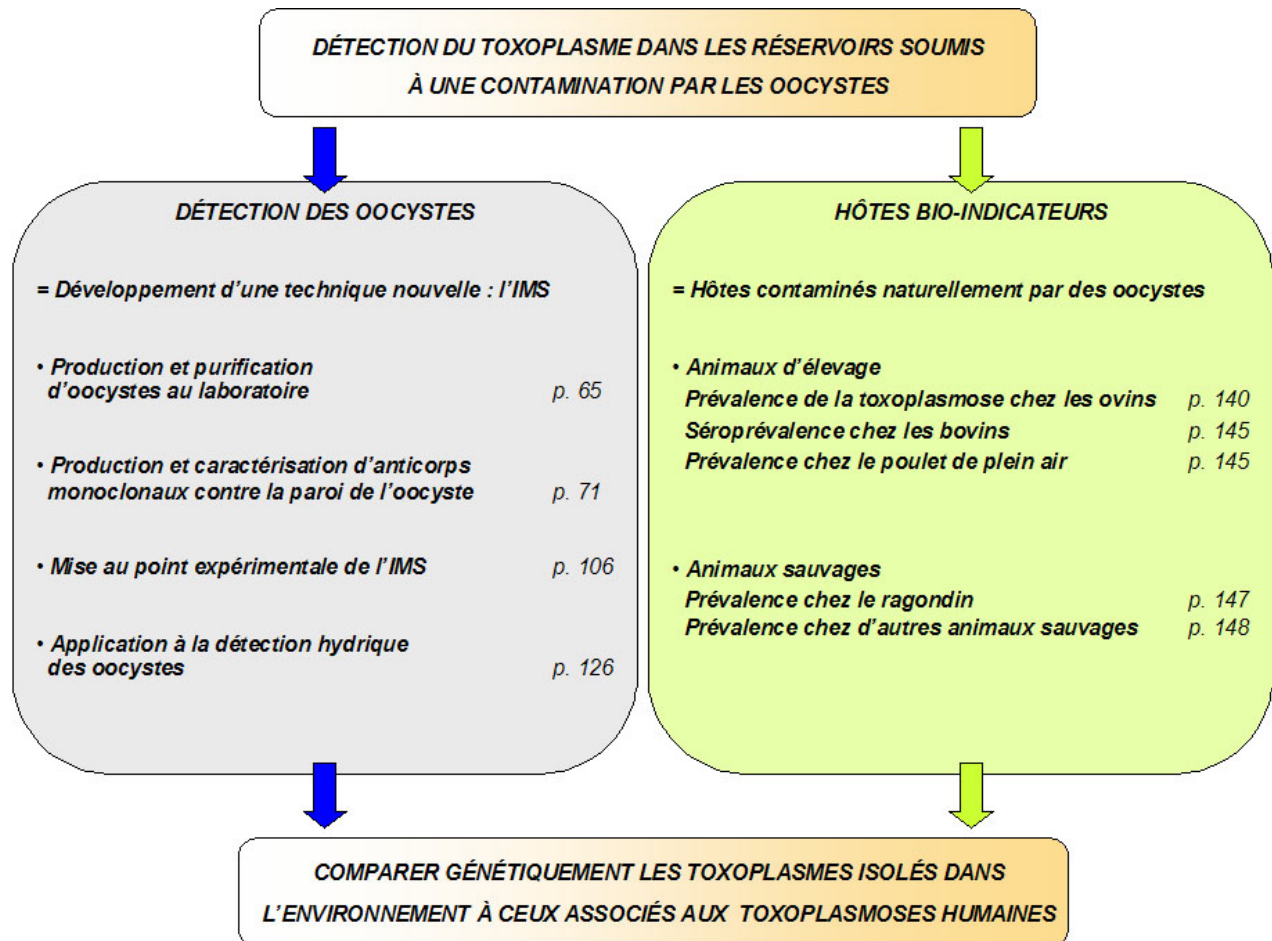


Figure 7 : Objectifs de l'étude et méthodologie appliquée.

# **PARTIE 2: ÉTUDE EXPERIMENTALE**

# 1. Parasites utilisés

## 1.1. *Toxoplasma gondii*

### 1.1.1. Souches

Plusieurs souches appartenant à des génotypes classiques (I, II et III), recombinant ou atypique ont été utilisées au cours de ce travail (annexe 2). Seules les souches RH et Prugnnaud (PRU) sont entretenues régulièrement dans le laboratoire en infectant par voie intrapéritonéale des souris Swiss-Webster femelles âgées de 5-6 semaines et pesant 22-25 g (Elevage Dépré, S<sup>T</sup>-Doulchard, 18), avec de l'ascite riche en tachyzoïtes (RH) ou une suspension de cerveaux de souris infectées 6 mois plus tôt (PRU).

### 1.1.2. Contrôle sérologique des animaux infectés

Un contrôle sérologique des souris est fait 4 à 6 semaines post-infection (p.i.) par la technique d'agglutination directe haute sensibilité (ADHS) appelée « MAT » (pour modified agglutination test) dans la littérature anglo-saxonne. Son principe repose sur l'agglutination de tachyzoïtes RH préalablement trypsinés et formolés (antigènes) par les anticorps anti-toxoplasmiques IgG présents dans le sérum des animaux infectés (sérologie positive). Dans le cas d'une sérologie négative, les tachyzoïtes sédimentent en bouton au fond des cupules de réaction.

Le protocole de Desmonts et Remington (1980) a été utilisé pour produire plusieurs lots d'antigènes (annexe 3). Chaque lot est préalablement évalué sur des sérums négatifs et faiblement positifs en test de lyse (dye test). Un lot conserve ses propriétés antigéniques pendant 1 an à 4°C. Une réaction est positive pour une dilution supérieure ou égale à 1/20.

Nous avons utilisé le test ADHS dans les études de séroprévalences animales présentées dans le paragraphe 4.



### 1.1.3. Production d'oocystes

#### 1.1.3.1. Chats

Cinq chats domestiques (*Felis catus*), âgés de 1,5 à 4,5 mois, ont été infectés pour produire des oocystes des souches PRU (4 chats) et P89 (1 chat) (tableau 5).

L'absence d'infection toxoplasmique des chats est vérifiée préalablement par trois examens parasitologiques des selles par la technique de Janeckso-Urbanyi (solution de iodomercurate de potassium, densité 1,44). Aucun oocyste de toxoplasme n'a été détecté. Un seul chat a pu faire l'objet d'une sérologie anti-toxoplasmique (ADHS négative < 1/20).

#### 1.1.3.2. Infection

Les chats, à jeun depuis 24 h, sont infectés par ingestion d'une suspension saline de cerveaux de souris contenant un maximum de 2600 kystes (tableau 5). Pendant 4 semaines, les chats sont isolés pour limiter les risques de contamination, et disposent d'une nourriture commerciale sans résidus et d'une litière non-végétale. Les selles sont collectées quotidiennement entre 1 et 21 j après infection et sont conservées à +4°C jusqu'à leur arrivée au laboratoire. Le début et la fin de l'émission sont mis en évidence par la technique de Janeckso-Urbanyi.

#### 1.1.3.3. Purification par flottation sur saccharose-phénol

Les oocystes sont purifiés par flottation sur des solutions de saccharose<sup>2</sup>-phénol d'une densité comprise entre 1,15 et 1,28. Afin d'obtenir des suspensions concentrées en oocystes contenant un minimum de débris, nous avons adapté la méthode de Dubey et al. (1972), en ajoutant un lavage préalable des selles dans de l'eau distillée contenant 0,1% de Tween-80 (annexe 4).

---

<sup>2</sup> Tous les réactifs utilisés au cours de ce travail sont fournis par Sigma-Aldrich (St Quentin Fallavier, France) sauf mention contraire.

<b>Chat n°</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
<b>Sexe</b>	F	M	F	F	F
<b>Age (mois)</b>	2,5	4,5	1,5	3	4
<b>Souche</b>	PRU	P89	PRU	PRU	PRU
<b>Inoculum (nb de kystes)</b>	240	2600	2200	800	500
<b>Période pré-patente (j)</b>	5	4	3	4	6
<b>Période patente (j)</b>	10	9	10	9	ND <sup>a</sup>
<b>Nb total d'oocystes collectés (x10<sup>6</sup>)</b>	70	35	130	250	50

**Tableau 5 : Caractéristiques de l'infection expérimentale de cinq chats par *T. gondii*.**

<sup>a</sup>ND, non déterminée.

## 1.1.3.4. Purification sur gradient discontinu de chlorure de césium

*Les suspensions d'oocystes contiennent encore des bactéries et de nombreux débris fécaux après flottation sur saccharose-phénol. Une purification plus fine est donc nécessaire avant d'utiliser ces oocystes pour la production d'anticorps monoclonaux. Le chlorure de césium a été retenu après des essais préliminaires peu concluants avec le Percoll<sup>®</sup> (rendement faible, co-localisation des oocystes avec certains débris).*

Le chlorure de césium (CsCl) est utilisé pour purifier les oocystes de cryptosporidies à partir de suspensions fécales brutes ou pré-traitées sur saccharose-phénol. Nous avons adapté la méthode de Kilani et Sekla (1987) aux oocystes de toxoplasme (Dumètre et Dardé, 2004) :

- les oocystes conservés en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> à 2% sont lavés deux fois dans de l'eau distillée (1200 g, 10 min) et une fois dans un tampon Tris-EDTA (Tris 50 mM, EDTA 10 mM, pH 7,4) (annexe 5). Le culot final est repris dans quelques millilitres de tampon Tris-EDTA.
- 1,5 ml de chacune des trois densités de CsCl (1,15-1,10-1,05) (annexe 5) sont superposés avec une pipette Pasteur dans des tubes de 16x76 mm. Un millilitre de la suspension d'oocystes est déposé au sommet du gradient.
- les tubes sont centrifugés (16000 g, 60 min, 4°C) dans une ultracentrifugeuse Centrikon T-1075 équipée d'un rotor à angle fixe.
- les oocystes purifiés forment une couche blanchâtre à l'interface 1,05-1,10 alors que débris et bactéries se concentrent dans le culot (figure 8). En pratique les trois premiers millilitres de chaque tube peuvent être récupérés. Ils sont lavés une fois dans l'eau distillée-Tween-80 à 0,1% et une fois dans l'eau distillée (1200 g, 15 min).
- les oocystes sont repris et conservés à +4°C dans une solution d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> à 2%.

### **Résultats-Discussion**

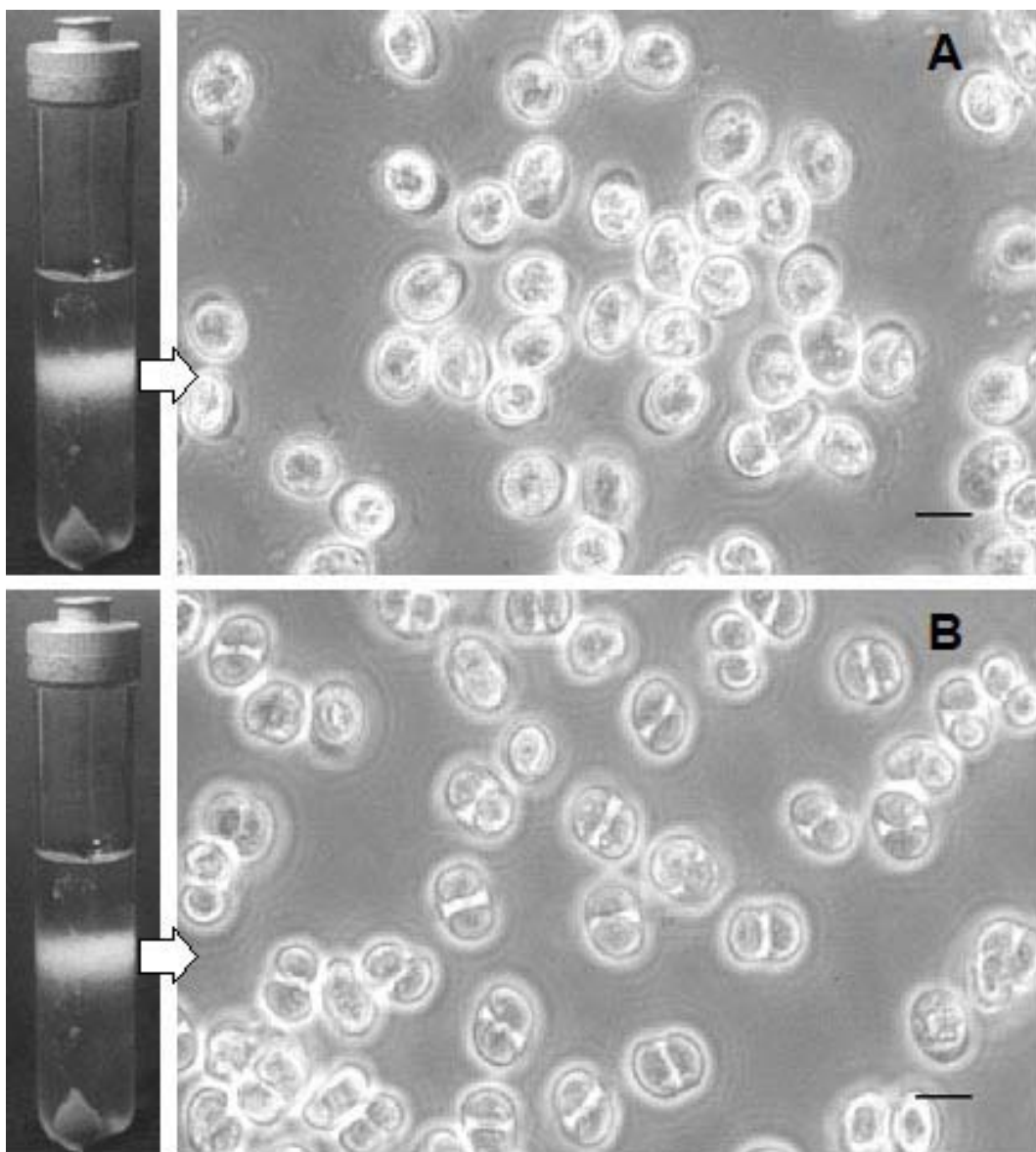
Cette technique nous a permis de purifier jusqu'à  $5.10^6$  oocystes par tube. Elle a été évaluée sur des suspensions d'oocystes sporulés ou non sporulés, conservées préalablement pendant 1, 10 et 18 semaines en acide sulfurique (tableau 6). Les rendements de purification obtenus pour les oocystes sporulés sont respectivement de 98,1%, 85,9% et 46,6%. Ils sont respectivement de 96,7%, 100% et 30,4% pour des oocystes non sporulés. Kilani et Sekla (1987) ont obtenu des résultats similaires avec un rendement >94% pour des cryptosporidies conservées moins de 8 semaines à 4°C, puis une diminution à 17,5% et 5,0% après respectivement 10 et 12 mois de conservation.

**La diminution du rendement de purification en fonction de l'âge des oocystes peut s'expliquer par :**

- **la diminution de la viabilité des oocystes.** Les oocystes observés dans les culots de centrifugation ont souvent un aspect granuleux et dégénéré, et semblent non viables. Leur densité >1,15 ne correspond pas à celle d'oocystes viables (1,04-1,14 suivant le stade de sporulation ; Dubey, Miller et al., 1970b). La viabilité des oocystes n'a pas pu être déterminée en l'absence d'un test approprié.
- **l'augmentation de la densité des oocystes** par interactions avec les débris fécaux. Une exposition prolongée à l'acide sulfurique pourrait modifier les propriétés physico-chimiques de la surface de l'oocyste. Elle favoriserait les interactions de la paroi avec les débris environnants, avec pour conséquence une augmentation de la densité de l'oocyste.

L'hypothèse combinée est que les oocystes non viables de toxoplasme ont un contenu interne et des propriétés de surface différents des oocystes viables. Cette hypothèse a été suggérée par Bukhari et Smith (1995) pour expliquer la forte proportion d'oocystes non viables de *C. parvum* dans les culots de centrifugation après purification sur saccharose-phénol.

***A notre connaissance, ce type de gradient n'avait jamais été utilisé pour purifier des oocystes de toxoplasme. Ce gradient de chlorure de césium permet de purifier plus de 85% des oocystes conservés moins de 10 semaines après isolement.***



**Figure 8 : Purification d'oocystes de *Toxoplasma gondii* sur gradient discontinu de chlorure de césium (échelle = 10 µm, x400). Les oocystes non sporulés (A) et sporulés (B) purifiés forment une couche blanchâtre à l'interface 1,05/1,10.**

Durée de conservation (semaine)	Oocystes purifiés (%)	
	Non sporulés	Sporulés
1 (n=3)	96,7 ± 12,8	98,1 ± 7,4
10 (n=3)	100,2 ± 2,5	85,9 ± 2,0
18 (n=3)	30,4 ± 4,8	46,6 ± 11,8

**Tableau 6 : Pourcentage d'oocystes purifiés sur gradient de chlorure de césium en fonction de leur durée de conservation à +4°C.**

## 1.2. Autres protozoaires

Les protozoaires du genre *Hammondia*, *Neospora*, *Cyclospora*, *Isospora*, *Eimeria*, *Cryptosporidium* et *Giardia* possèdent un stade infectant (oocyste ou kyste) pouvant être rencontré dans les mêmes prélèvements que les oocystes de toxoplasme (annexe 6). Certaines de leurs caractéristiques nous ont conduits à évaluer la réactivité croisée des anticorps monoclonaux produits contre l'oocyste de toxoplasme (cf. paragraphe 2) :

- les oocystes d'*Hammondia* sp. et de *Neospora caninum* ne peuvent pas être distingués de ceux du toxoplasme par microscopie optique ou sous excitation UV.
- les oocystes d'*E. maxima* et d'*E. tenella*, bien que structurellement différents de ceux du toxoplasme, émettent la même autofluorescence bleue sous excitation.
- les oocystes de *Cryptosporidium* sp. (15 espèces reconnues) et les kystes de *Giardia intestinalis* peuvent être très prévalents dans l'eau et le sol. Ils ont une résistance physique et chimique similaire à celle des oocystes de toxoplasme.

La provenance et les conditions de conservation des espèces testées sont décrites en annexe 7.

## **2. Production et caractérisation de deux anticorps monoclonaux dirigés contre la paroi de l'oocyste de *T. gondii***

*L'obtention d'anticorps monoclonaux contre l'oocyste de toxoplasme est un prérequis à la mise au point d'une IMS des oocystes de toxoplasme car il n'existe pas actuellement d'anticorps monoclonaux contre la paroi de l'oocyste.*

*Cette partie décrit la production de deux anticorps monoclonaux obtenus par culture d'hybridomes et leur caractérisation préliminaire par immunofluorescence indirecte (IFI), western-blot (WB) et immunomicroscopie électronique (IME).*

### **2.1. Production d'anticorps monoclonaux par culture d'hybridomes**

La production des anticorps monoclonaux est réalisée selon les méthodes décrites par Harlow et Lane (1988) et Riahi (1997), à l'exception de la préparation de l'antigène.

#### **2.1.1. Préparation de l'antigène**

La paroi de l'oocyste sporulé, purifiée des autres constituants de l'oocyste (sporocyste, sporozoïte) a été choisie comme antigène pour deux raisons :

- les oocystes présents dans l'eau ou le sol sont probablement à l'état sporulé
- il est attendu que cette stratégie d'immunisation n'induirait pas de toxoplasmose chez l'animal et limiterait la croissance de clones sécrétant des immunoglobulines contre les autres constituants de l'oocyste.

Après purification sur gradient de chlorure de césium, les oocystes sont fractionnés et les parois sont séparées sur un gradient de iodixanol. Le iodixanol (ou 5,5'-[(2-hydroxy-1-3 propanediyl) –bis (acetylamino)] –bis [N,N'-bis(2,3-dihydroxypropyl)-2,4,6-triiodo-1,3-benzenecarboxamide, Optiprep™, AbCys S.A., Paris] permet une purification des parois d'oocystes et des sporocystes intacts sur un même gradient, contrairement à un gradient de Percoll® avec lequel seuls les sporocystes peuvent être purifiés (Everson et al., 2002). Cette méthode a été adaptée pour notamment optimiser la fragmentation des oocystes :

- 2 à  $8.10^6$  oocystes purifiés sur CsCl et conservés en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> à 2%, sont lavés deux fois en eau distillée et une fois en PBS à 1200g, 10 min.
- le culot final est repris dans 500 µl d'une solution de iodixanol à 30% (v/v) dans un tampon sucrose (250 mM)-Tris (15mM).
- les oocystes sont transférés dans un tube eppendorf contenant 350 mg de billes de verre stériles (diamètre 200-400 µm).
- le tube est vortexé à vitesse maximale pendant 3 min. La fragmentation est contrôlée par observation de 5 µl de la suspension toutes les 30 secondes après 1 min 30 d'agitation.
- la suspension d'oocystes fragmentés (500 µl) est transférée dans un tube en polystyrène de 15 ml à fond rond. Les billes sont lavées avec 2 ml de iodixanol à 30% (v/v) et cette solution est ajoutée à la précédente.
- elle est recouverte par quatre solutions de iodixanol respectivement à 25, 20, 15 et 5% (v/v) et de 2,5 ml chacune, préparées extemporanément dans le tampon sucrose-Tris.
- les tubes sont centrifugés à 1000 g, 60 min (sans frein).
- l'interface 5/15% est riche en sporocystes. Les parois purifiées sont récupérées à l'interface 25/30%. Un examen microscopique ne retrouve d'oocyste ou de sporocyste intact dans cette fraction.
- chaque bande est prélevée séparément et lavée dans 4 volumes de PBS à 1200 g, 10 min (sans frein).



- les parois purifiées sont aliquotées en PBS. Elles sont conservées à  $-20^{\circ}\text{C}$  pendant au moins 1 mois pour limiter la viabilité d'éventuels oocystes ou sporocystes résiduels contenant des sporozoïtes viables.

## 2.1.2. Immunisation

### 2.1.2.1. Schéma d'immunisation

Dix souris femelles Balb/c âgées de 7 semaines (Charles River Laboratories, L'Arbresle, France) sont immunisées, par voie intrapéritonéale, avec  $2,5 \cdot 10^4$  parois purifiées mélangées à volume égal avec de l'adjuvant complet puis incomplet de Freund (tableau 7). Leur sérum préimmun sert de contrôle négatif pour les tests sérologiques ultérieurs.

Une prise de sang est réalisée au niveau du sinus rétro-orbitaire 21 j avant la fusion pour d'une part éliminer en ADHS une infection toxoplasmique et d'autre part titrer les anticorps polyclonaux contre les oocystes par immunofluorescence indirecte (IFI).

L'ADHS est restée négative, témoignant de l'absence de développement d'une infection chez les souris immunisées. Deux souris, positives au 1/640 en IFI oocystes (seuil de positivité fixé au 1/40) reçoivent une immunisation boost par voie intraveineuse (i.v.) 3 j avant la fusion (tableau 7).

Délai	Préparation antigénique	Adjuvant	Volume total injecté	Voie d'immunisation
<i>J<sub>-84</sub></i>	$2,5 \cdot 10^4$ parois dans du PBS	Complet de Freund	300 $\mu\text{l}$	i.p.
<i>J<sub>-63</sub></i>	$2,5 \cdot 10^4$ parois dans du PBS	Incomplet de Freund	300 $\mu\text{l}$	i.p.
<i>J<sub>-42</sub></i>	$2,5 \cdot 10^4$ parois dans du PBS	Incomplet de Freund	300 $\mu\text{l}$	i.p.
<i>J<sub>-21</sub></i>	<i>Titration des anticorps polyclonaux (par immunofluorescence indirecte)</i>			
<i>J<sub>-3</sub></i>	$2,5 \cdot 10^4$ parois dans du PBS	Non	100 $\mu\text{l}$	i.v.
<i>J<sub>0</sub>→</i>	<i>Fusion puis culture des hybridomes</i>			

**Tableau 7 : Schéma d'immunisation pour obtenir des anticorps monoclonaux contre la paroi de l'oocyste de toxoplasme.**

### 2.1.2.2. Détection d'anticorps par immunofluorescence indirecte (IFI)

L'IFI a été choisie comme technique de détection des anticorps polyclonaux et monoclonaux car elle permet d'apprécier la localisation du marquage des anticorps sur l'oocyste. L'IFI est réalisée contre des oocystes sporulés, parfois préalablement fragmentés, et dans certains cas contre des oocystes non sporulés. La méthode retenue pour l'IFI est la suivante :

- les parasites sont lavés plusieurs fois en eau distillée et en PBS puis sont déposés sur des lames téflonnées de 24 puits à raison de 500 à 1000 éléments par puits sous un volume de 10-15  $\mu$ l.
- les lames sont séchées à l'air et fixées 10 min à  $-20^{\circ}\text{C}$  à l'acétone pure.
- les lames sont rincées 2x5 min en PBS puis séchées à l'air.
- 10  $\mu$ l de surnageant pur de culture d'hybridome contenant les anticorps à tester sont déposés par puits. Un témoin négatif (PBS, milieu de culture, hybridome négatif ou sérum préimmun) et un témoin positif (sérum polyclonal) sont incorporés dans chaque série. Les anticorps sont incubés 30 min à  $37^{\circ}\text{C}$  en chambre humide.
- les lames sont rincées 3x5 min en PBS et séchées à l'air.
- un anticorps de chèvre anti-IgG (H+L) murine couplée à la fluorescéine (IM0819, Immunotech, Marseille) est utilisé comme anticorps secondaire, dilué au 1/50 en PBS-bleu d'Evans, à raison de 10  $\mu$ l/puits. Les anticorps sont incubés 30 min à  $37^{\circ}\text{C}$  en chambre humide.
- les lames sont rincées 3x5 min en PBS et séchées à l'air
- les lames sont montées en glycérine tamponnée (Fluoprep, bioMérieux) et observées au microscope à épifluorescence : filtre d'excitation, 450-480 nm ; miroir dichroïque, 500 nm ; filtre d'émission, 515 nm. Des photographiques sont acquises via une station vidéo couplée à un microscope Olympus BH2

Ultérieurement, les IFI ont été faites sur des suspensions parasitaires en microtubes, avec ou sans traitement par l'acétone, permettant de limiter le bruit de fond.

### 2.1.3. Fusion et culture d'hybridomes

#### 2.1.3.1. Culture des cellules SP2/O

Sept jours avant la fusion, les cellules myélomateuses SP2/O (fournies par le Dr . N. Kessler, Laboratoire de Virologie, Faculté de Médecine de Lyon) sont mises en culture dans un milieu Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM Hybri-Max) contenant 20% de sérum de bœuf fœtal (SBF), 10000 unités/L de pénicilline, 10 mg/L de streptomycine et 50 mg/L de gentamycine (Panpharma). La numération et la viabilité des cellules sont contrôlées sur cellule de Malassez après coloration au bleu trypan. Une concentration minimale de  $10^6$  cellules/ml et une viabilité supérieure à 90% sont requises pour la fusion.

#### 2.1.3.2. Préparation du milieu conditionné

Le milieu conditionné est un milieu nourricier utilisé au début de chaque étape de la culture des hybridomes. Pour préparer le milieu conditionné, les splénocytes de deux souris Balb/c saines sont cultivés pendant trois jours dans du DMEM à 20% de SBF. Le surnageant récupéré (milieu conditionné) est filtré stérilement et conservé à  $-20^{\circ}\text{C}$ . Environ 100 ml de milieu conditionné sont obtenus à partir d'une rate.

#### 2.1.3.3. Fusion

A  $J_0$ , les splénocytes des 2 souris présentant les taux d'anticorps les plus élevés sont fusionnés avec des cellules SP2/O en présence de PEG-DMSO.

Les rates sont prélevées stérilement, lavées puis dilacérées dans du DMEM préchauffé à  $37^{\circ}\text{C}$  à l'aide d'une seringue montée avec une aiguille de 19 gauges. Les gros agrégats sont éliminés par décantation pendant 5 min. Les splénocytes sont lavés deux fois en DMEM à 400 g, 10 min puis numérés en cellule de Malassez.

La fusion est réalisée selon un rapport de 4 splénocytes pour 1 cellule myélomateuse. Les cellules sont centrifugées ensemble à 400 g pendant 10 min. La fusion des deux types cellulaires s'effectue sur le culot, sous agitation dans un bain marie à  $37^{\circ}\text{C}$  et avec des milieux préchauffés à  $37^{\circ}\text{C}$ . Les étapes de la fusion sont les suivantes :

- 1 ml de PEG-DMSO est ajouté goutte à goutte pendant 45 secondes, tout en mélangeant délicatement les cellules avec le bout de la pipette et en agitant doucement le tube
- 1 ml de DMEM est ajouté goutte à goutte pendant 45 sec
- 10 ml de DMEM sont ajoutés goutte à goutte pendant 2 min
- 10 ml de DMEM sont ajoutés goutte à goutte pendant 2 min
- 10 ml de DMEM sont ajoutés goutte à goutte pendant 2 min
- les cellules sont centrifugées à 400 g pendant 10 min
- les cellules sont reprises dans du DMEM contenant de l'hypoxanthine-thymidine et centrifugées à 400 g pendant 10 min
- les cellules sont reprises dans du DMEM-HT à 20% de SBF additionné d'OPI 2X. HT et OPI (oxaloacétate-pyruvate-insuline) sont des compléments du milieu de culture. Le nombre de cellules est à  $10^6$  cellules pour 100  $\mu$ l de milieu.

#### 2.1.3.4. Culture des hybridomes

Les cellules sont mises en culture dans des plaques à fond plat de 96 puits sous 100  $\mu$ l de milieu conditionné et 100  $\mu$ l de DMEM-HT à 20% SBF et 2X OPI dans chaque puits. Nous avons ainsi préparé 4 plaques (soit 384 puits) à partir des splénocytes de 2 souris immunisées. Les conditions d'entretien des hybridomes sont les suivantes :

- à  $J_{+1}$  : 100  $\mu$ l de milieu sont aspirés doucement et remplacés par 100  $\mu$ l de DMEM contenant HAT, 10% de SBF et 1X OPI. HAT (hypoxanthine-aminoptérine-thymidine) permet d'éliminer les cellules non fusionnées
- $J_{+2}$  et  $J_{+3}$  : changer le milieu comme à  $J_{+1}$
- $J_{+6}$  : la totalité du milieu (200  $\mu$ l) est aspirée et remplacée par le même volume de milieu neuf. La croissance des hybridomes est contrôlée au microscope inversé (x100). Certains apparaissent visibles à l'œil nu.

- J<sub>+9</sub> : changer le milieu comme à J<sub>+6</sub>

#### 2.1.3.5. Détection des anticorps

Dix jours après la fusion, les surnageants purs de culture des hybridomes les plus développés sont testés en IFI contre des oocystes de toxoplasme.

#### 2.1.3.6. Expansion et clonage

Les hybridomes des puits positifs en IFI sont transférés dans des plaques à 24 puits. Les cellules à confluence sont ensuite transférées dans des boîtes de 35 mm de diamètre puis dans des flacons de 25 cm<sup>2</sup>. A chaque étape de transfert, le milieu de culture DMEM-20%SBF-OPI2X est mélangé à un volume égal de milieu conditionné. Après chaque étape de transfert, une moitié des cellules est congelée en azote liquide. Les surnageants de culture sont testés en IFI puis conservés à -20°C.

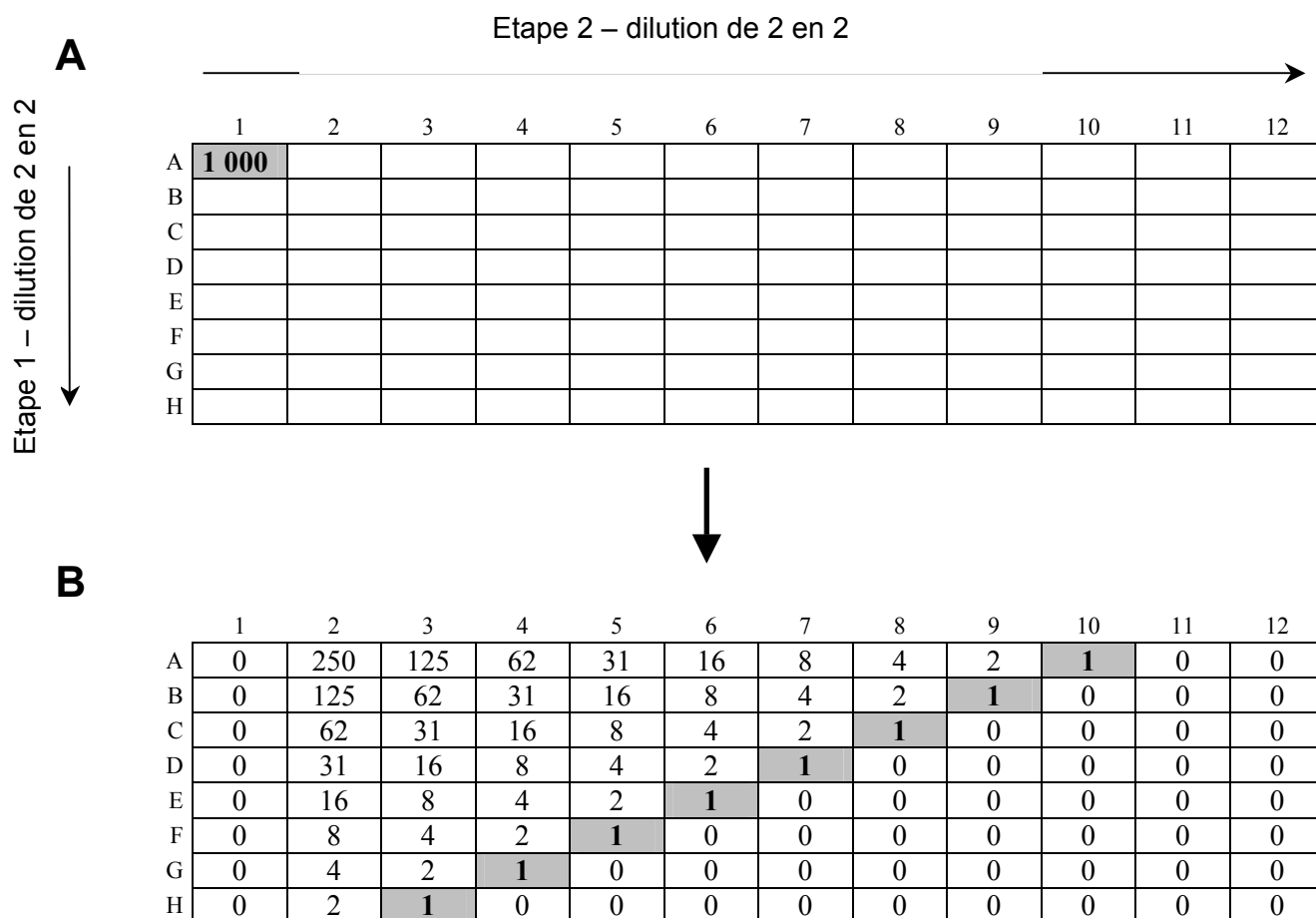
Le clonage de chaque hybridome est effectué par la méthode de dilution limite quand la viabilité des cellules en expansion est supérieure à 90% (figure 9):

- dans une plaque de 96 puits (1 plaque / hybridome à cloner), déposer 50 µl de milieu conditionné dans chaque puits
- déposer 50 µl de DMEM à 20% SBF et 2X OPI dans chaque puits
- ajouter 1000 cellules d'hybridome, sous un volume de 100 µl, dans le puits A1
- diluer de 2 en 2 dans la colonne de gauche
- diluer de 2 en 2 de la colonne de gauche jusqu'à la dernière colonne à droite
- la croissance des clones est observée au microscope inversé (x100). Les conditions de culture sont les mêmes que précédemment.

Un clonage réussi doit aboutir en 7 jours à une série de puits alignés en diagonale qui contiennent le même nombre de clones (figure 9). Les puits contenant un seul clone sont choisis pour détecter les anticorps. Chaque hybridome fait l'objet de trois clonages successifs afin d'obtenir une population cellulaire réellement clonale. Chaque clonage est suivi d'une

phase d'expansion au cours de laquelle une partie des cellules et les surnageants sont congelés.

*Après la fusion, 11 puits se sont montrés positifs en IFI puis seulement 5 après expansion. Pour 3 hybridomes, la production d'anticorps n'a pas été retrouvée après expansion. Au final, seuls deux hybridomes ont pu être clonés : les hybridomes 3G4 et 4B6.*



**Figure 9 : Clonage d'hybridome par la méthode de dilution limite.** (A) Etape 1, dilution de 2 en 2 dans la colonne 1 ; étape 2, dilution de 2 en 2 de la colonne 1 à 12 avec une pipette multicanaux. (B) Nombre théorique de cellules dans chaque puits après dilution limite.

## 2.1.3.7. Isotype et concentration en anticorps monoclonaux

L'isotype de chaque anticorps monoclonal est déterminé par une méthode ELISA décrite par Pinaud et al. (2001). Les anti-immunoglobulines et les immunoglobulines de contrôle sont fournies par Southern Biotechnology Associates Inc. (annexe 8). Les réactions sont réalisées dans une plaque de 96 puits à fond plat :

- des anti-immunoglobulines (chèvre anti-IgM, G1, G2a, G2b, G3 de souris) non marquées sont diluées à 1 µg/ml dans un tampon carbonate (pH 8,3) et incubées toute la nuit à 4°C à raison de 100 µl / puits.
- les puits sont vidés et bloqués 15 min à 37°C avec 100 µl de DMEM à 10% de SBF / puits.
- les puits sont lavés 3 fois en PBS à 0,1% de Tween-20.
- les surnageants de culture sont dilués au 1/10 et au 1/100 en DMEM-10%SBF et déposés à raison de 100 µl / puits. Des IgM, IgG1, G2a, G2b et G3 murines diluées à 1 µg/ml en DMEM-10%SBF sont utilisées comme contrôle positif (100 µl / puits). Un contrôle négatif (DMEM-10%SBF) est également incorporé. Surnageants et contrôles sont incubés 2 heures à 37°C.
- les puits sont lavés 3 fois en PBS-Tween-20.
- des anticorps de chèvre anti-IgM, G1, G2a, G2b ou G3 de souris couplés à la phosphatase alcaline, sont dilués à 1 µg/ml en DMEM-10%SVF et utilisés comme antisérums de révélation (100 µl / puits).
- après 2 h d'incubation à 37°C, les puits sont lavés 3 fois en PBS-Tween-20.
- 100 µl de substrat de la phosphatase alcaline à 1 mg/ml sont ajoutés par puits. Une coloration jaune se développe rapidement. Elle est bloquée par l'addition de 50 µl / puits de NaOH 3 M.
- l'absorbance est déterminée à 405 nm par un lecteur de plaque SpectraCount (Packard, Meriden, CT).



***Cette méthode ELISA a montré une sécrétion d'IgM par les hybridomes 3G4 et 4B6.***

La concentration en anticorps dans les surnageants de culture a été déterminée par la méthode décrite ci-dessus, pour l'isotypage. Les surnageants de culture sont dilués au 1/25 et 1/250 dans du DMEM-10%SBF et sont incubés avec des anti-IgM et IgM de contrôles appropriées (annexe 8).

**2.2. Etudes antigéniques**

Les antigènes reconnus par les anticorps monoclonaux (AcM) 3G4 et 4B6 sont étudiés par immunofluorescence indirecte (IFI), immunohistochimie (uniquement pour les stades entéroépithéliaux), western-blot (WB) et immunomicroscopie électronique (IME).

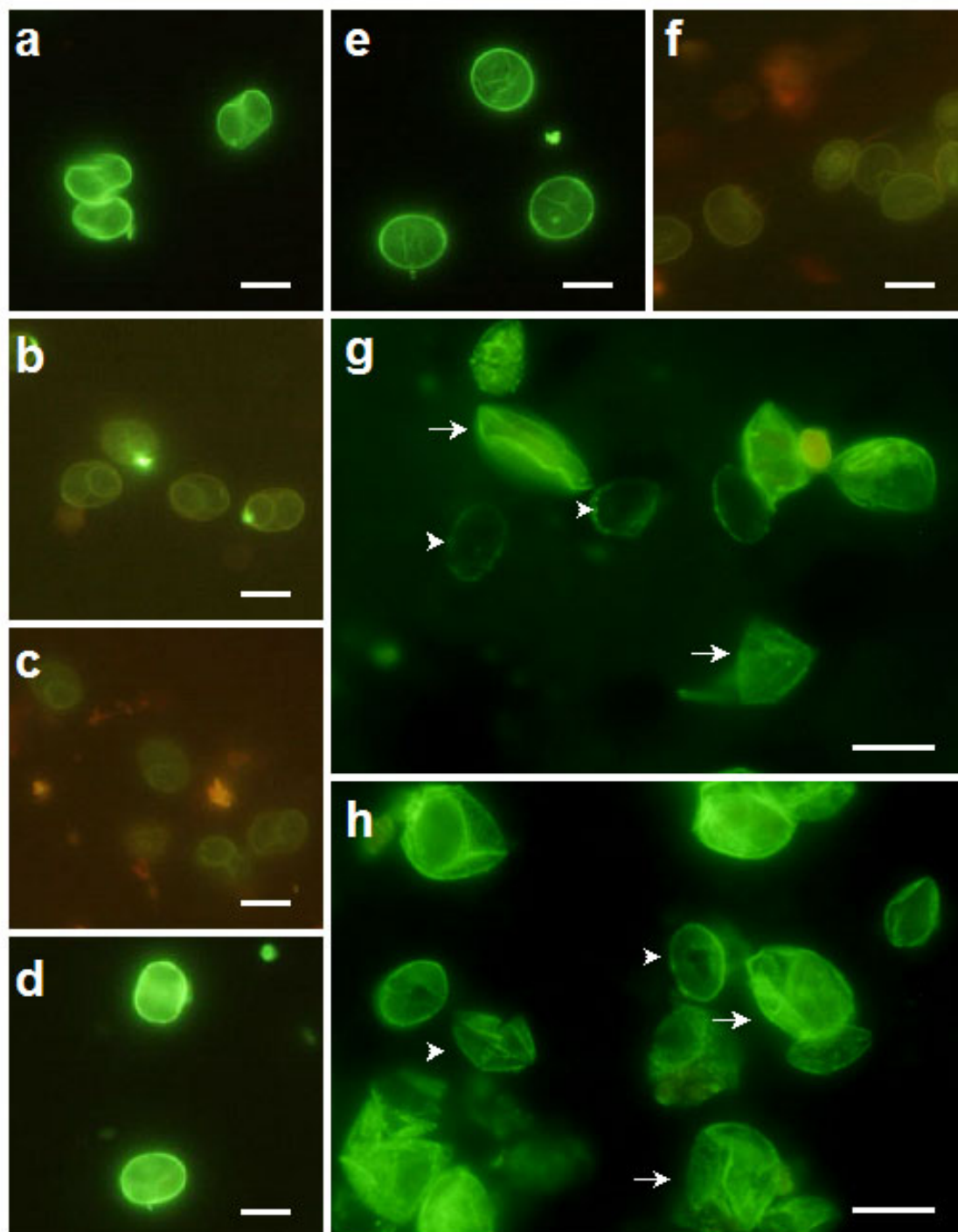
**2.2.1. Immunofluorescence indirecte**

L'IFI est testée sur des oocystes sporulés ou non et sur des tachyzoïtes et bradyzoïtes/kystes du toxoplasme.

**2.2.1.1. Oocystes**

Les oocystes purifiés sur CsCl et conservés en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> à 2% sont utilisés initialement comme antigènes figurés. La paroi des oocystes non sporulés et sporulés est marquée uniformément par 3G4 avec ou sans traitement préalable à l'acétone (figures 10a et 10e). Les parois d'oocystes et les sporocystes, libérés après sonication, sont aussi reconnues (figure 10g). 3G4 ne réagit pas avec le sporozoïte dans ces conditions.

L'anticorps 4B6 est spécifique de l'oocyste sporulé et de sa paroi interne. Seuls les oocystes qui possèdent une ouverture dans leur paroi (figure 10b) et les oocystes soniqués sont reconnus par cet anticorps (figure 10h), avec ou sans traitement préalable à l'acétone. La paroi des sporocystes est aussi marquée (figure 10h). 4B6 ne réagit pas avec le sporozoïte.



**Figure 10 : Réactivité en IFI des AcM 3G4 et 4B6 avec les oocystes de toxoplasme.** 3G4 marque les oocystes sporulés (a), non sporulés (e) et les parois d'oocystes sporulés (flèches) et des sporocystes (têtes de flèches) obtenus après sonication (g). 4B6 marque les oocystes sporulés (b), et les parois d'oocystes sporulés (flèches) et des sporocystes (têtes de flèches) après sonication (h), mais pas avec les oocystes non sporulés (f). Contrôles négatif (c) et positif (d). Echelle = 10  $\mu$ m. x400 (a-f), x1000 (g-h).

Dans le but d'intégrer les AcM 3G4 et 4B6 dans une méthode de détection des oocystes dans l'environnement, nous avons cherché à savoir si différents paramètres pouvaient modifier les marquages initialement observés en IFI (tableaux 8 et 9). Les paramètres retenus sont :

- ***le génotype des oocystes***

Certains anticorps monoclonaux dirigés contre les bradyzoïtes et les tachyzoïtes permettent de différencier certains isolats (Parmley et al., 1994) La diversité génotypique peut ainsi être à l'origine d'une certaine diversité antigénique. Cette diversité n'a jamais été mise en évidence chez l'oocyste. Pour cela, nous avons incubé les deux AcM avec des oocystes de génotypes différents (tableau 8).

***Quelque soit le génotype utilisé, nous obtenons un marquage identique à celui initialement observé pour des oocystes de type II.***

- ***le milieu et la durée de conservation des oocystes.***

Les oocystes conservés dans des solutions de  $H_2SO_4$  à 2% ou de  $K_2Cr_2O_7$  à 2,5% ont des profils identiques de marquage. Pour vérifier que les anticorps reconnaissaient aussi des oocystes n'ayant subi aucun traitement chimique préalable, les selles d'un chat infecté avec l'isolat TgCkCo24 sont lavées avec de l'eau distillée, puis une partie est sporulée dans de l'eau distillée. ***Le marquage obtenu après conservation dans l'eau distillée est le même que pour des oocystes conservés dans des solutions acides. La qualité du marquage est constante après plusieurs années de conservation des oocystes en  $H_2SO_4$  2% à 4°C (tableau 8).***

- ***les traitements physiques et chimiques visant à inactiver les oocystes.***

Une température supérieure à 60-70°C permet d'inactiver rapidement les oocystes.

***Les deux AcM reconnaissent des oocystes inactivés après 10 à 30 minutes dans de l'eau distillée portée à 90°C (tableau 9).***

Conditions (souche)	Réactivité des AcM en IFI	
	3G4	4B6
<b>Génotype<sup>a</sup></b>		
II (PRU)	+	+
III (M7741, TgCkCo24)	+	+
Recombinant (P89)	+	+
Atypique (GUY-02-KOE)	+	+
<b>Milieu de conservation</b>		
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> à 2% (PRU)	+	+
K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> à 2,5% (PRU)	+	+
ED (TgCkCo24)	+	+
<b>Durée de conservation (mois) dans H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> à 2% (PRU)</b>		
1	+	+
12	+	+
24	+	+
36	+	+
84	+	+

<sup>a</sup>les oocystes de type I, très difficiles à obtenir expérimentalement, n'ont pas été testés

**Tableau 8 : Réactivité en IFI des AcM 3G4 et 4B6 selon le génotype, le milieu et la durée de conservation des oocystes de toxoplasme.**

L'hypochlorite de sodium (NaClO) a peu d'effet sur la viabilité des oocystes mais il endommage la paroi externe de l'oocyste. Des oocystes ont été incubés avec deux concentrations de NaClO (30 et 60 g/L) jusqu'à 30 min à 4°C, à l'obscurité. La concentration de 30 g/L correspond à celle d'une solution d'eau de javel à 9,6% de chlore actif diluée au ¼ pour un usage domestique. Après 3 lavages en ED et PBS, une IFI est réalisée.

***20 à 30% des oocystes perdent leur autofluorescence après 30 min dans une solution à 30 g/L, mais cette concentration ne modifie pas la qualité du marquage des AcM 3G4 et 4B6 (tableau 9). Le pourcentage d'oocystes marqués par le 4B6 tend même à augmenter avec la durée d'incubation (20 min). Pour 3G4, le marquage est encore constant après 30 min à 60 g/L. A cette concentration, une diminution ou une absence de marquage est constaté pour 50% des oocystes incubés avec 4B6.***

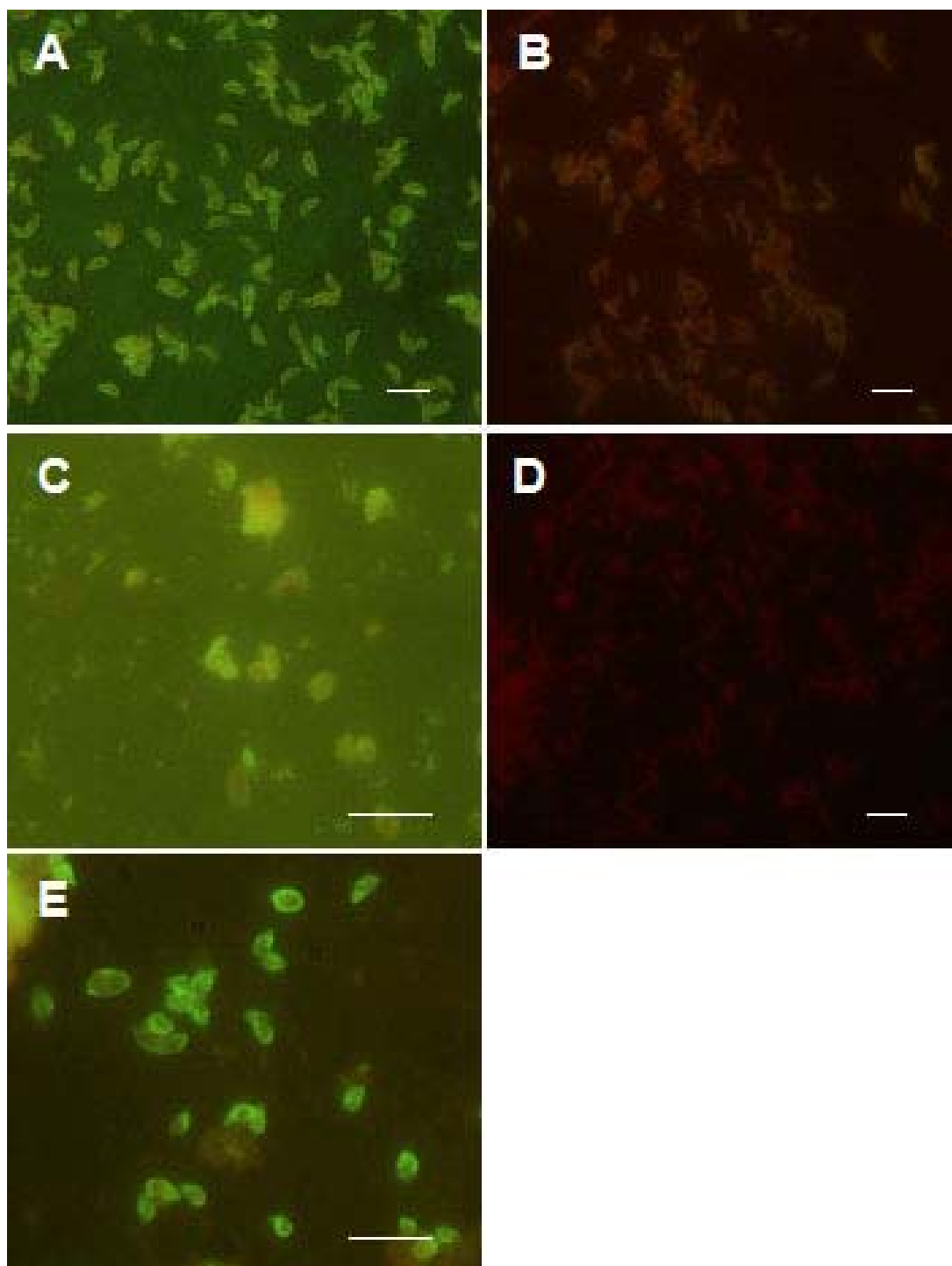
Conditions (souche)	Réactivité des AcM en IFI	
	3G4	4B6
<b>Durée d'inactivation dans ED à 90°C (PRU)</b>		
10 min	+	+
20 min	+	+
30 min	+	+
<b>Exposition à deux concentrations de NaClO (PRU)</b>		
30 g/L		
5 min	+	+
10 min	+	+
20 min	+	+ <sup>b</sup>
30 min <sup>a</sup>	+	+ <sup>b</sup>
60 g/L		
30 min	+	+/- <sup>c</sup>

**Tableau 9 : Réactivité en IFI des AcM 3G4 et 4B6 après inactivation physique ou chimique des oocystes de toxoplasme.**

<sup>a</sup> une diminution de l'autofluorescence de 20-30% des oocystes est observée

<sup>b</sup> une augmentation du pourcentage d'oocystes marqués par 4B6 est notée dans ces conditions

<sup>c</sup> environ 50% des oocystes ne sont pas marqués à cette concentration



**Figure 11 : Réactivité en IFI des AcM 3G4 et 4B6 avec les tachyzoïtes du toxoplasme.** 3G4 marque faiblement les tachyzoïtes intrapéritonéaux RH (A) et les tachyzoïtes produits sur cellules LLCMK2 (C). 4B6 ne marque ni les tachyzoïtes RH (B), ni les tachyzoïtes PRU produits sur cellules TGIH (D). La photo E est un contrôle positif avec un anti-P30 de tachyzoïtes Echelle = 10  $\mu$ m. x400 pour A,B,D, et x1000 pour C et E.

## 2.2.1.2. Tachyzoïte et bradyzoïte / kyste

La réactivité des deux AcM est évaluée sur :

- des tachyzoïtes de la souche RH issus du liquide d'ascite de souris.
- des tachyzoïtes de la souche PRU obtenus in vitro sur cellules TGIH (annexe 9A). Celles-ci sont dérivées de cellules sarcomateuses TG180 adaptées à la culture in vitro par le Dr. Andres Puime (Institut d'Hygiène de Montevideo, Uruguay).
- des tachyzoïtes et des kystes de la souche PRU obtenus in vitro sur cellules LLCMK2 (cellules épithéliales de rein de singe rhesus) (Dantas-Leite et al., 2004) (annexe 9B).

L'IFI est réalisée après fixation des toxoplasmes au paraformaldéhyde à 4% dans un tampon phosphate 0,1 M (15 min à 22°C), à l'acétone (15 min à -20°C), puis comme décrit précédemment. Un AcM anti-P30 de tachyzoïte (clone 1E53D3 fourni par J.F. Dubremetz) et un AcM anti-P34 de bradyzoïte (Tomavo et al., 1991) (clone T82C21A1 fourni par J.F. Dubremetz) sont utilisés au 1/100 comme contrôles positifs.

L'utilisation d'AcM spécifiques de stade met en évidence la présence de tachyzoïtes et de kystes dans les cultures de cellules LLCMK2 avec une nette prédominance de tachyzoïtes. L'AcM 4B6 ne reconnaît aucun stade asexué quelque soit leur mode de production (figures 11B et 11D). Un faible marquage des tachyzoïtes, obtenus in vivo et in vitro, est observé avec l'AcM 3G4 sur des tachyzoïtes RH et PRU (figures 11A et 11C). La réactivité du 3G4 avec les kystes n'est pas évidente.

## 2.2.1.3. Réactivités croisées avec d'autres protozoaires

***Les anticorps 3G4 et 4B6 réagissent contre les oocystes de coccidies phylogénétiquement proches du toxoplasme et qui émettent la même autofluorescence bleue sous UV : H. hammondi, H. heydorni, N. caninum, C. cayetanensis, E. maxima et E. tenella (figures 12 et 13).***

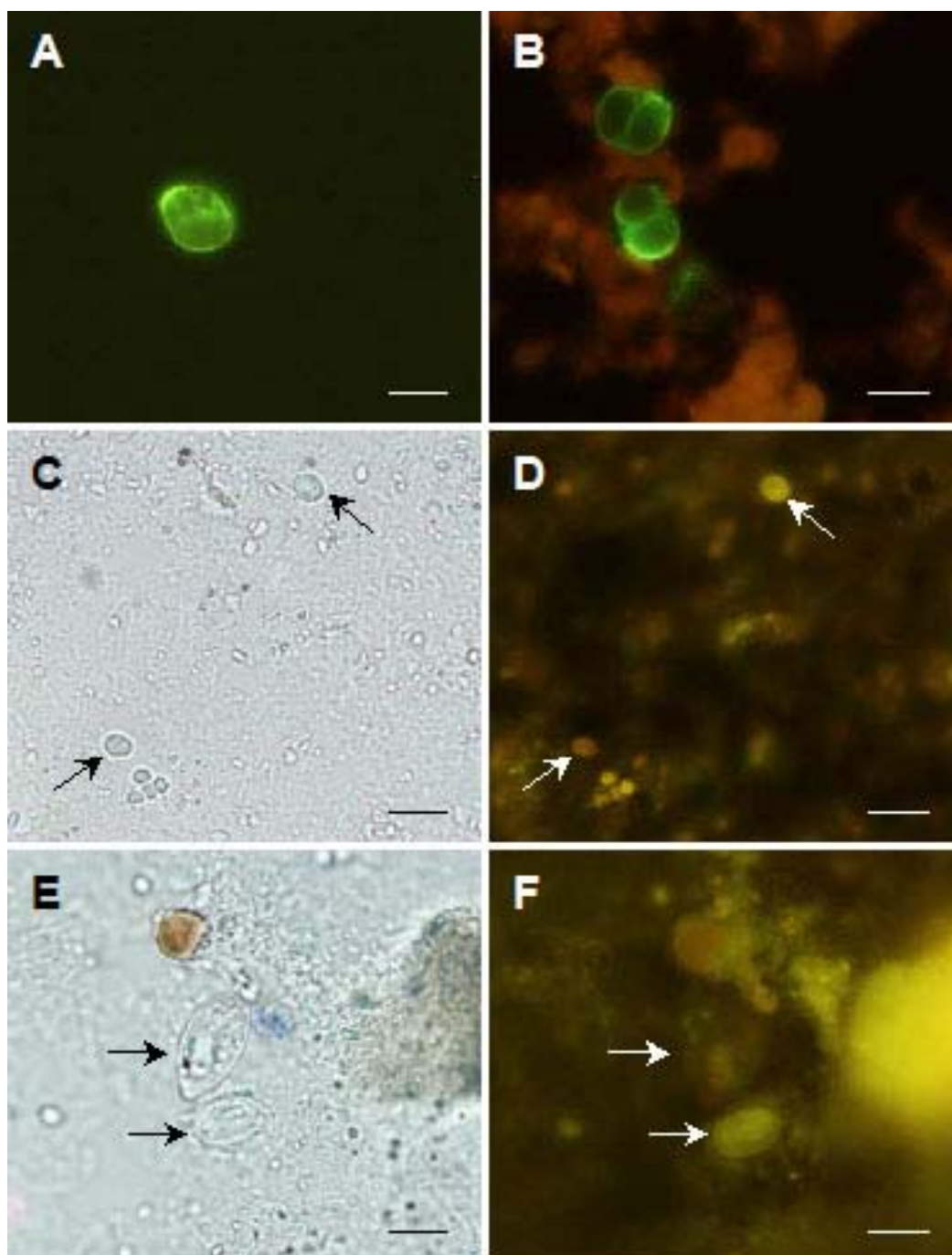
La différence de réactivité entre les deux anticorps est la même qu'avec les oocystes de toxoplasme : 3G4 réagit avec les formes non sporulée et sporulée, 4B6 uniquement avec la forme sporulée. Pour ce dernier anticorps, un marquage de 100% des oocystes sporulés est

obtenu après leur sonication. 4B6 réagit également avec la paroi du sporocyste, qu'elle soit intacte ou fragmentée. Le marquage des sporozoïtes n'est pas évident et leur dékystement n'a pas été effectué en raison d'un faible nombre d'oocystes disponibles pour chaque espèce.

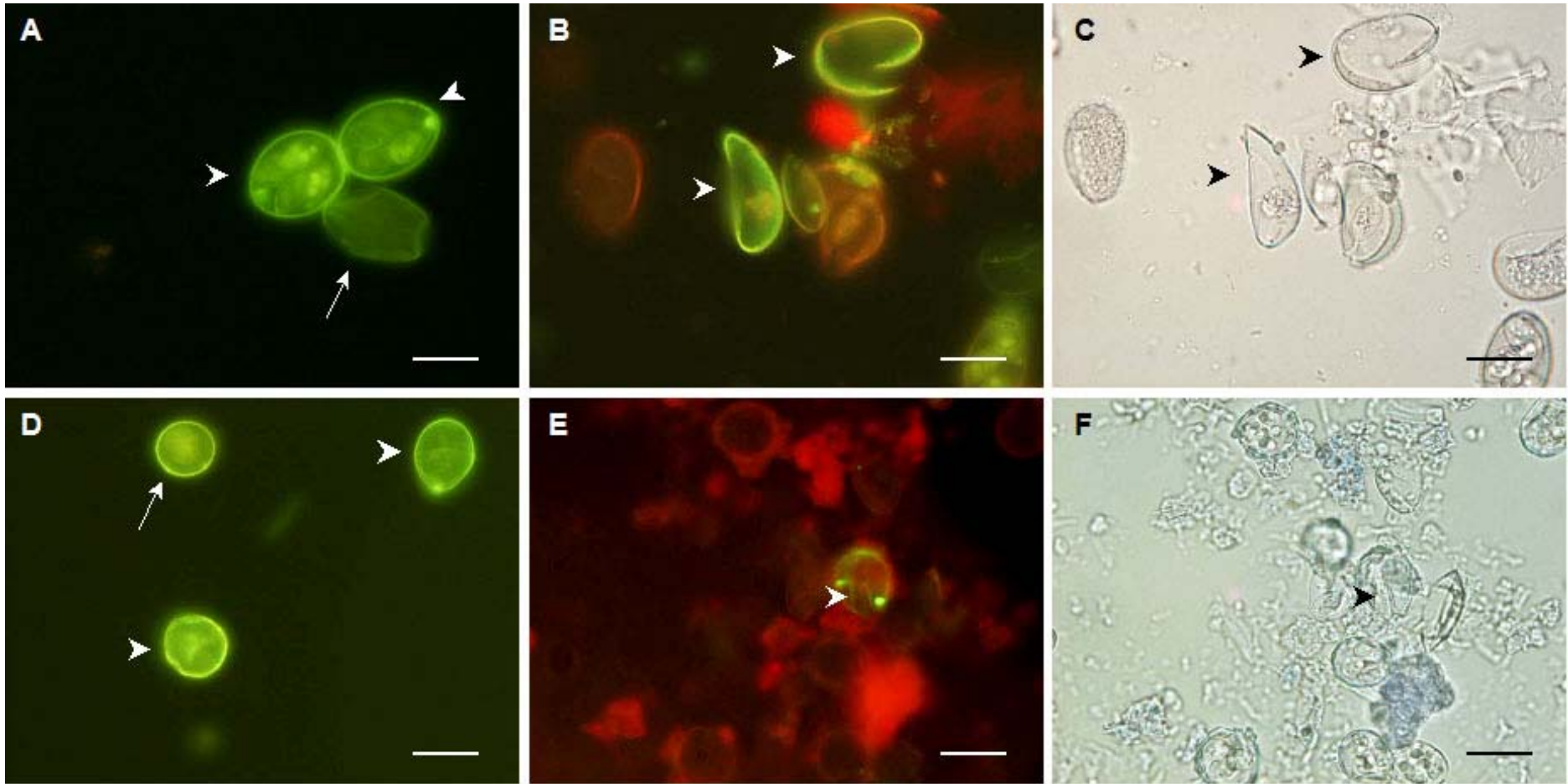
Les oocystes de *Cryptosporidium* sp. et les kystes de *Giardia intestinalis*, qui n'ont pas de fluorescence propre sous UV, ne sont pas marqués.

Le tableau 10 résume la réactivité des anticorps 3G4 et 4B6 contre les différents stades de toxoplasme et d'autres protozaires, dont la provenance est indiquée en annexe 7.





**Figure 12 : Réactivité en IFI des AcM 3G4 et 4B6 avec les formes de résistance de plusieurs protozoaires.** (A) Oocyste sporulé de *Neospora caninum* marqué par 3G4. (B) 4B6 reconnaît la paroi interne des oocystes sporulés d'*Hammondia hammondi*. (C,D) Deux oocystes de *Cryptosporidium* sp. négatifs avec 3G4. (E,F) Deux kystes de *Giardia intestinalis* négatifs avec 4B6. Echelle = 10 µm. x400.



**Figure 13 : Réactivité en IFI des AcM 3G4 et 4B6 avec les oocystes d'*E. maxima* (A,B) et d'*E. tenella* (D,E).** 3G4 marque les oocystes sporulés (têtes de flèche) et non sporulés (flèche) d'*E. maxima* (A) et d'*E. tenella* (D). 4B6 réagit avec les parois d'oocystes fragmentés d'*E. maxima* (B comparée à C) et d'*E. tenella* (E comparée à F). Echelle = 20  $\mu\text{m}$ . x400.

Protozoaires (Stades)	3G4	4B6
<b><i>Toxoplasma gondii</i></b>		
Oocyste non sporulé / sporulé	+ / +	- / +
Sporocyste / sporozoïte	+ / -	+ / -
Tachyzoïte / bradyzoïte	+ / peu évident	- / -
<b><i>Hammondia hammondi</i></b>		
Oocyste non sporulé / sporulé	+ / +	- / +
Sporocyste / sporozoïte	+ / NF	+ / NF
<b><i>Hammondia heydorni</i></b>		
Oocyste non sporulé / sporulé	+ / +	- / +
Sporocyste / sporozoïte	+ / NF	+ / NF
<b><i>Neospora caninum</i></b>		
Oocyste non sporulé / sporulé	+ / +	- / +
Sporocyste / sporozoïte	+ / NF	+ / NF
<b><i>Cyclospora cayetanensis</i></b>		
Oocyste non sporulé / sporulé	+ / +	- / +
<b><i>Eimeria tenella</i></b>		
Oocyste non sporulé / sporulé	+ / +	- / +
Sporocyste / sporozoïte	+ / NF	+ / NF
<b><i>Eimeria maxima</i></b>		
Oocyste non sporulé / sporulé	+ / +	- / +
Sporocyste / sporozoïte	+ / NF	+ / NF
<b><i>Cryptosporidium</i> sp.</b>		
Oocyste	-	-
<b><i>Giardia intestinalis</i></b>		
Kyste	-	-

**Tableau 10 : Tableau récapitulatif de la réactivité des AcM 3G4 et 4B6 contre les différents stades de *T. gondii* et différents protozoaires.**

### 2.2.2. Immunohistochimie

Une étude immunohistochimique a été menée en collaboration avec l'équipe de David Ferguson (Oxford, Royaume-Uni) pour mettre en évidence un marquage éventuel, surtout par 3G4, des stades entéroépithéliaux du toxoplasme, en particulier des WFB du stade macrogamète et de la paroi du jeune oocyste.

Les coupes d'intestin de chat sont obtenues après infection par les souches M3 (type II) (Ferguson et al., 1999) ou PRU (Mounier, 1982). Le protocole d'immunohistochimie est celui décrit par Ferguson et al., 1999. Les réactions positives sont révélées par un anticorps secondaire couplé à la peroxydase.

***Par cette technique, les stades entéroépithéliaux ne sont pas reconnus par nos deux AcM.***

### 2.2.3. Western-blot

#### 2.2.3.1. Matériel et méthode

##### ***Préparation d'antigènes***

- les oocystes sont lavés une fois dans l'ED et une fois en PBS (1250 g, 10 min, 4°C)
- le culot est repris dans le tampon de traitement (annexe 10) en conditions non réductrices (sans 2-mercapto-éthanol (2-ME)) de façon à obtenir une concentration de  $5 \cdot 10^5$  à  $10^6$  oocystes/10  $\mu$ l (volume déposé dans chaque puits du gel de migration).
- les oocystes sont soniqués jusqu'à ce que 95% des oocystes et des sporocystes soient détruits
- cette suspension est ensuite portée à 100°C pendant 10 min pour libérer les antigènes de surface puis centrifugée à 10 000 g pendant 20 min à 4°C.
- le surnageant contenant les antigènes solubles est aliquoté et conservé à -20°C.

***SDS-PAGE et transfert***

Le type d'électrophorèse en gel de polyacrylamide SDS (SDS-PAGE) utilisé est le système discontinu (Laemmli, 1970) (annexe 11). Le transfert est effectué selon une méthode de transfert semi-sec (annexe 11).

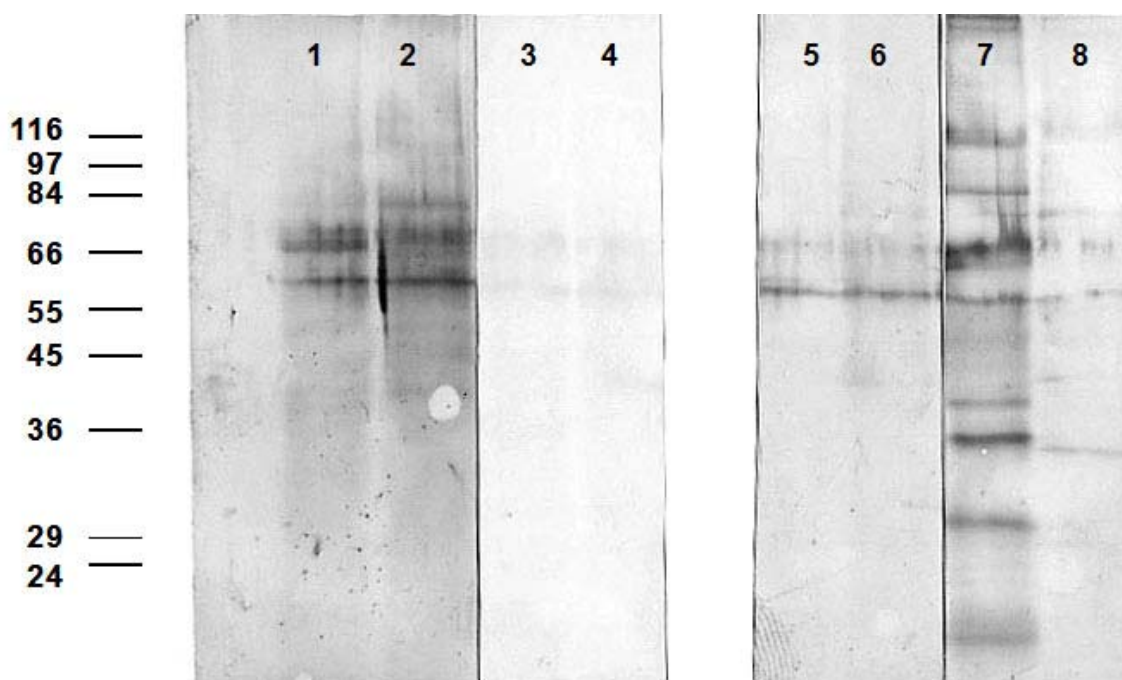
***Immunoréaction***

- les bandelettes sont saturées pendant une nuit dans du PBS à 3% de BSA, à température ambiante, sous agitation douce.
- après trois lavages de 10 min en PBS à 0,5% Tween 20 (PBS-T), chaque bandelette est incubée avec un surnageant de culture de l'hybridome 3G4 ou 4B6 dilué au 1/50 dans du PBS à 3% de BSA.
- les bandelettes sont incubées 2 h à température ambiante, sous agitation. Un contrôle négatif (sérum de souris séronégatives) et un contrôle positif (sérum polyclonal de souris infectées par des oocystes PRU) sont dilués respectivement au 1/50 et 1/100 et sont incubés dans le même temps.
- les bandelettes sont lavées 3x10 min en PBS-T
- elles sont incubées 90 min à température ambiante, sous agitation avec un sérum polyclonal de chèvre anti-Ig totales de souris marqué à la peroxydase (HRP) (P0447, DakoCytomation SA, Trappes, France) dilué au 1/1000 du PBS
- les bandes protéiques reconnues par les AcM et les contrôles sont révélées en incubant quelques minutes les bandelettes dans le tampon de révélation (annexe 10).
- la révélation est arrêtée par trempage des bandelettes dans de l'eau distillée. Après séchage, la comparaison des standards de poids moléculaires permet d'évaluer le poids moléculaire des antigènes révélés.

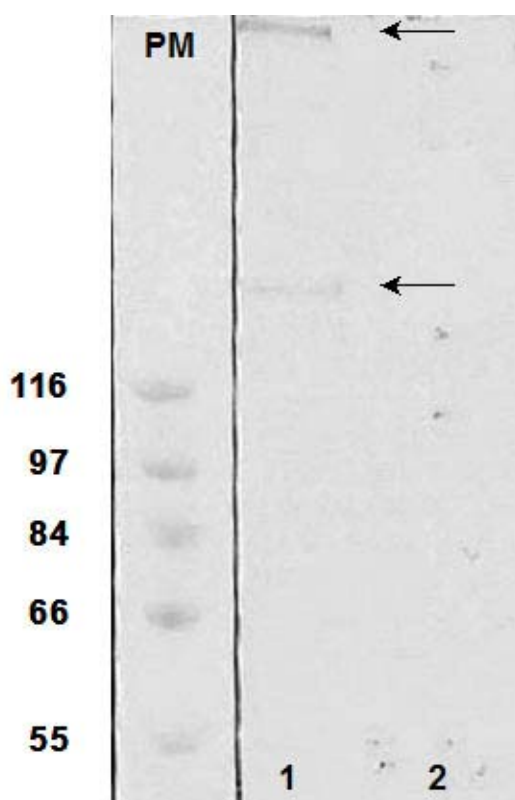
### 2.2.3.2. Résultats

Un sérum polyclonal révèle plusieurs bandes entre 116 et 33 kDa (figure 14, piste 7) chez l'oocyste sporulé. Les blots sont discrets pour la forme non sporulée et plus difficiles à interpréter (figure 14, piste 8). Un sérum négatif met en évidence deux bandes faibles de 58 et 67-69 kDa pour la forme sporulée et non sporulée (figure 14, pistes 5 et 6).

Ces deux dernières bandes sont reconnues plus fortement par l'AcM 3G4 (figure 14, pistes 1 et 2). L'AcM 4B6 met en évidence deux bandes supérieures à 116 kDa uniquement pour la forme sporulée (figure 15, piste 1), confirmant ainsi les marquages en IFI. Ces deux bandes ne sont pas toujours mises en évidence par western blot (figure 14, pistes 4).



**Figure 14 :** Western blots d'oocystes sporulés (pistes 1,3,5,7) et non sporulés (pistes 2,4,6,8) de toxoplasme ( $2,5 \cdot 10^5$  oocystes réduits/piste). 1,2 : incubation avec AcM 3G4 ; 3,4 : incubation avec AcM 4B6 ; 5,6 : pool de sérums négatifs ; 7,8 : sérum polyclonal.



**Figure 15 :** Western blots d'oocystes sporulés (1) et non sporulés (2) de toxoplasme ( $5 \cdot 10^5$  oocystes réduits /piste). 1,2 : incubation avec AcM 4B6. PM : poids moléculaire (kDa).

## 2.2.4. Immunolocalisation par microscopie électronique

Elle a été réalisée au laboratoire UMR CNRS 5539 Dynamique moléculaire des interactions membranaires par le Dr. Jean-François Dubremetz.

### 2.2.4.1. Matériel et méthode

#### *Préparation d'antigènes*

Ferguson et al. (1975) ont montré qu'il est difficile de fixer et d'inclure correctement des oocystes intacts étant donné la structure et la composition particulières de la paroi de l'oocyste. Après plusieurs essais peu concluants avec des suspensions d'oocystes fragmentés par sonication, nous avons choisi une méthode de fixation et d'inclusion très rapide sur des oocystes entiers.

- les oocystes envoyés en ED sont centrifugés.
- ils sont fixés dans une solution de paraformaldéhyde à 8% en tampon phosphate de sodium 0,2 M pH 7,4 pendant 48 heures à 4°C.
- les oocystes sont repris dans une solution de PBS à 10% de SVF (PBS-SVF) pendant 2 h, puis dans du PBS à 5% de gélatine de peau de bœuf à 37°C.
- les oocystes sont immédiatement centrifugés à 4°C pour obtenir un culot stable.
- ce culot est découpé en fragments d'1 mm<sup>3</sup> environ qui sont repris dans une solution de sucrose 2,3 M et de polyvynilpyrrolidone à 10% en tampon phosphate 0,1 M (pH 7,4) pendant une nuit.
- les fragments sont déposés sur les supports d'ultracryotomie et congelés dans l'azote liquide.
- les blocs obtenus sont coupés sur ultracryotome Leica Ultracut S équipé d'un dispositif de cryosection FC4 opérant à -100°C. Les coupes sont collectées sur des gouttes de sucrose à 2,3 M déposées sur des grilles parlodion-carbone.
- ces préparations sont immédiatement utilisées pour l'immunoréaction.



**Immunoréaction**

Elle se fait à 20°C :

- les grilles sont incubées sur des gouttes de PBS-SVF pendant 30 min.
- puis pendant 1 h dans l'AcM 3G4 ou 4B6 dilués au 1/50 en PBS-SVF.
- après lavages 5x2 min en PBS, les grilles sont incubées 1 h dans un sérum de lapin anti-souris dilué au 1/400 en PBS-SVF.
- après lavages 5x2 min en PBS, elles sont incubées 30 min dans une solution de protéine A couplée à des particules d'or colloïdal de 10 nm diluée au 1/50 en PBS.
- après lavages 5x2 min en PBS et 2x2 min en ED, les grilles sont colorées dans un mélange de méthyl cellulose à 2% dans ED (9 volumes) et d'acétate d'uranyle à 4% dans ED (1 volume) pendant 10 min.
- après séchage, les grilles sont observées sur un microscope électronique JEOL 1200 CX à 70 kV et les images enregistrées sur négatif argentique.

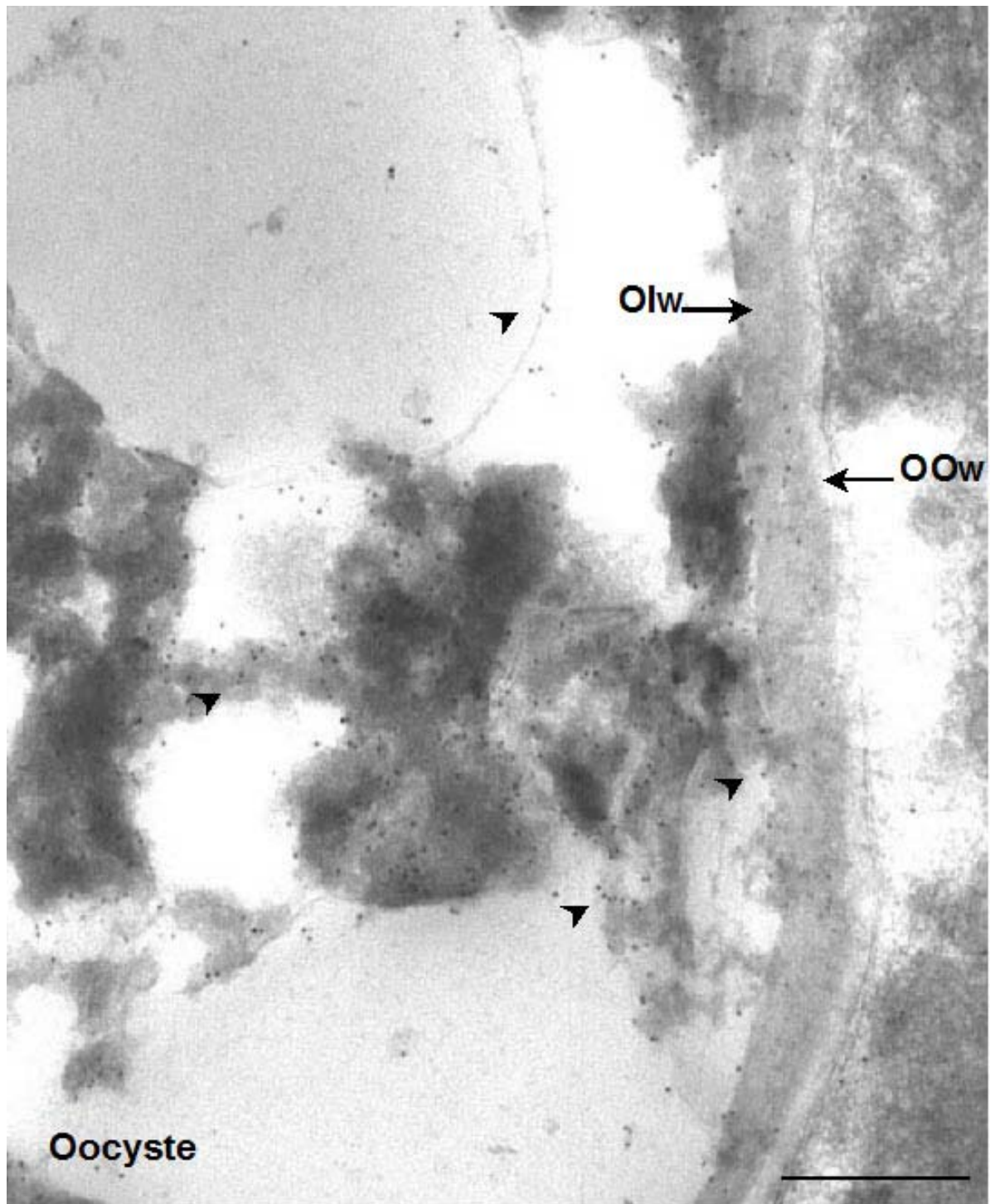
## 2.2.4.2. Résultats

**AcM 3G4**

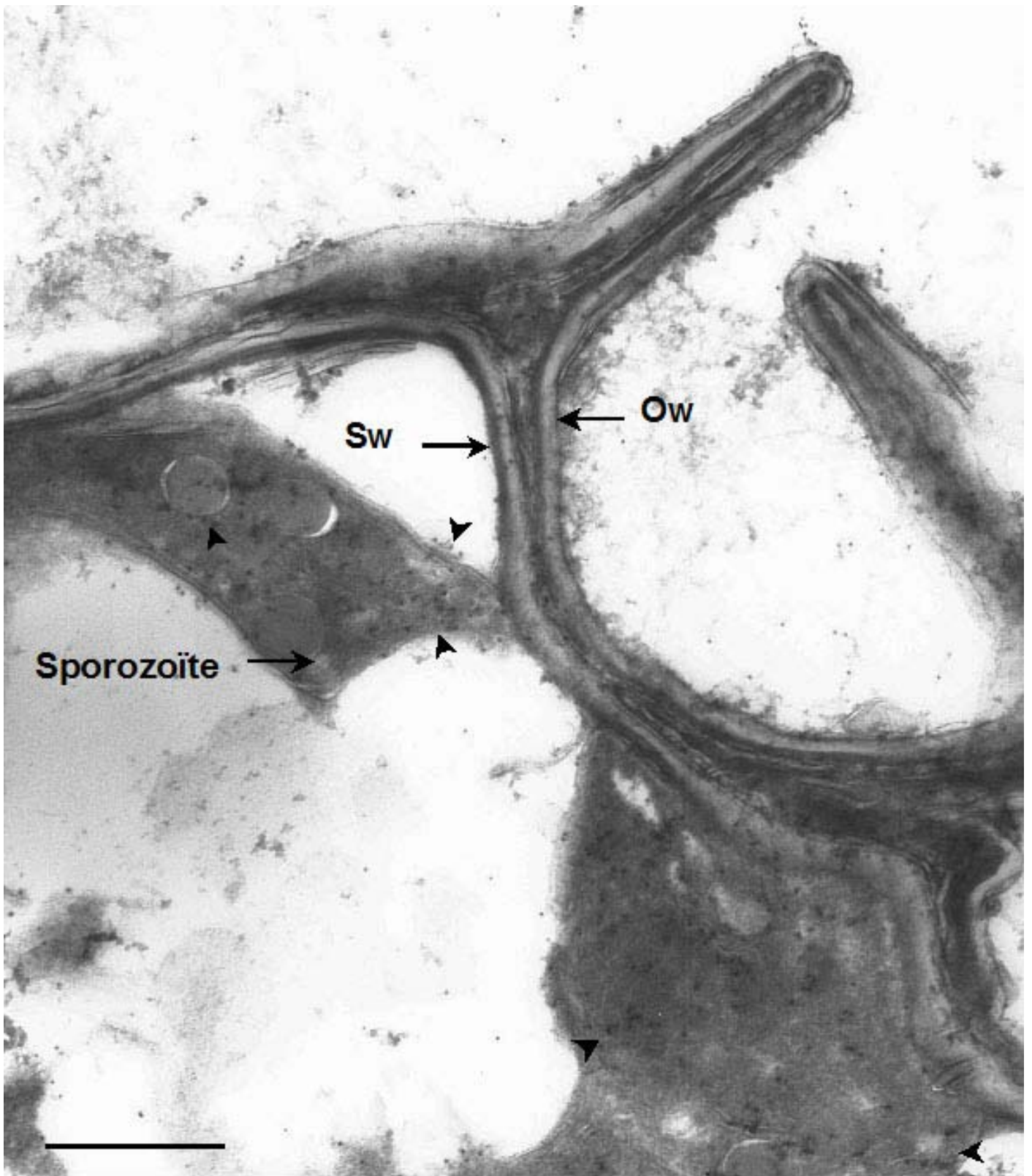
Un marquage est obtenu sur la paroi interne (électron-dense) de l'oocyste non sporulé et sporulé (bien visible sur la figure 16 plus que sur la figure 17). L'intérieur de l'oocyste non sporulé est également marqué. La figure 17 semble montrer que cet AcM réagit aussi contre le sporozoïte. D'autres marquages doivent être effectués pour confirmer et affiner cette observation.

**AcM 4B6**

L'oocyste non sporulé n'est pas marqué confirmant les résultats de l'IFI et du western-blot. Au contraire, la paroi externe du sporocyste est fortement reconnue (figure 18). Il n'a pas été possible d'observer un marquage de la paroi interne de l'oocyste, comme celui obtenu en IFI.



**Figure 16 : Réactivité de l'AcM 3G4 en IME avec l'oocyste non sporulé de toxoplasme.**  
OIw, paroi interne ; OOw, paroi externe. Echelle = 500 nm.



**Figure 17 : Réactivité de l'AcM 3G4 en IME avec l'oocyste sporulé de toxoplasme. Sw, paroi du sporocyste ; Ow, paroi de l'oocyste. Echelle = 1  $\mu$ m.**



**Figure 18 : Réactivité de l'AcM 4B6 en IME avec un sporocyste de toxoplasme. SIw, paroi interne du sporocyste ; SOW, paroi externe. Echelle = 1  $\mu$ m.**

## 2.3. Discussion - Conclusion

Dans le but de détecter les oocystes de toxoplasme dans l'eau par séparation immunomagnétique, nous avons produit des anticorps monoclonaux dirigés contre la paroi de l'oocyste.

L'immunisation de souris avec des parois purifiées d'oocystes sporulés a permis d'obtenir deux anticorps (3G4 et 4B6) dirigés contre ces parois. Cette stratégie d'immunisation a empêché le développement d'une infection toxoplasmique et a probablement limité le développement d'hybridomes sécrétant des anticorps dirigés contre le sporozoïte, qui est le constituant le plus immunogène d'un oocyste de toxoplasme (Kasper et al., 1984) ou de *C. parvum* (McDonald et al., 1991 ; Weir et al., 2000). L'obtention d'IgM monoclonales était attendue car de nombreux travaux montrent une production d'anticorps monoclonaux dirigés contre la paroi des oocystes de plusieurs coccidies, généralement de classes M puis G1 (Kasper et al. (1984) ; Bonnin et al., 1991 ; McDonald et al., 1991 ; Karim et al., 1996 ; Weir et al., 2000 ; Liao et al., 2001).

### 2.3.1. Réactivité des anticorps produits

#### 2.3.1.1. 3G4

Cet anticorps est très ubiquitaire car il réagit avec plusieurs structures de l'oocyste. Il marque également le tachyzoïte.

- 3G4 reconnaît, en WB, une bande à 58 kDa et une à 67-69 kDa. Ces deux bandes sont également révélées, plus faiblement, par un pool de sérums de souris séronégatives. Cette réactivité inattendue pourrait s'expliquer par la présence d'anticorps dits « naturels » dans le sérum des souris n'ayant jamais été en contact avec des oocystes. Ces anticorps seraient dirigés contre des antigènes présentant une réactivité croisée avec les antigènes de 58 et 67-69 kDa présents chez l'oocyste de toxoplasme.
- l'absence d'un marquage immunohistochimique des WFB du macrogamète et de la paroi de l'oocyste intraépithélial suggère que l'antigène reconnu par 3G4 ne participe pas à la formation de celle-ci. Cela pourrait sembler surprenant car l'antigène est présent dans la paroi de l'oocyste fraîchement émis. Ce résultat devra être confirmé

car il est possible que l'isotype de 3G4 (IgM) et son mode d'obtention (seulement à partir des antigènes natifs) ne permettent pas un marquage immunohistochimique approprié selon le protocole utilisé (David Ferguson, communication personnelle). La faible quantité de matériel disponible pour ces techniques est actuellement un facteur limitant pour mener des investigations supplémentaires.

- 3G4 semble marquer la paroi externe de l'oocyste sporulé en IFI, mais l'IME montre un marquage de la paroi interne et d'autres constituants internes de l'oocyste. Ces différences de réactivité s'expliquent sans doute par les différences de traitement des oocystes dans les 2 techniques. Le marquage interne a pu être ignoré par l'IF qui ne permet pas aux anticorps de pénétrer dans les oocystes intacts, ni de différencier précisément le marquage des parois interne et externe. La localisation de l'antigène sur la paroi externe, ignorée par l'IME, est cependant certaine en raison des résultats obtenus en IMS. Nos résultats montrent que la paroi externe de l'oocyste est assez immunogène pour induire une réponse anticorps, alors que Kasper et al. (1984) avaient émis l'hypothèse d'une absence de structures antigéniques dans cette paroi.
- il est intéressant de constater un marquage de la paroi de l'oocyste non sporulé mais aussi de son contenu amorphe. Il pourrait exister des épitopes communs entre les deux formes sporulées et non sporulées comme chez *E. tenella* et *E. maxima* (Mouafo et al., 2002 ; Belli et al., 2003). L'expression de cet antigène pourrait être régulée avant, pendant et après la sporulation. Certaines protéines de l'oocyste non sporulé d'*E. tenella* sont exprimées de manière régulée pendant la sporulation (Fetterer et Barfield, 2003).
- le sporozoïte n'est pas reconnu par 3G4 en IFI alors qu'il est fortement reconnu en IME. Le marquage du sporozoïte est assez inattendu même si l'existence d'épitopes ou d'antigènes partagés par la paroi de l'oocyste et les autres constituants (sporocyste et sporozoïte) est documentée pour *T. gondii* (Kasper et al., 1984), *H. hammondi*, *E. tenella* et *E. maxima* (Speer et al., 1989 ; Riahi et al., 2000 ; Belli et al., 2003). Le rôle de cette protéine chez le sporozoïte est encore à déterminer. Il est possible que certaines protéines soient sécrétées par le sporozoïte et incorporées à la paroi de l'oocyste ou du sporocyste. Cet événement a été montré chez *C. parvum* où des

antigènes de parois ont été associés à des vésicules observées entre les sporozoïtes et la paroi de l'oocyste (Entrala et al., 2001).

- la réactivité de 3G4 en IFI avec le tachyzoïte est également inattendue. Il existe plusieurs antigènes communs aux stades oocyste/sporozoïte, tachyzoïte et bradyzoïte (Gross et al., 1995 ; Speer et al., 1995). Il n'y a pas eu d'étude extensive menée pour localiser ces antigènes à part celle de Ferguson et al. (2000) qui a montré l'expression d'une protéine MIC4-like dans la paroi du macrogamète mature et de l'oocyste intraépithélial. Le western blot et l'IME sur des tachyzoïtes pourraient préciser la nature de cet antigène avec en perspective une production d'anticorps monoclonaux à partir du tachyzoïte et réagissant avec la paroi de l'oocyste.

#### 2.3.1.2. 4B6

L'IME confirme les résultats obtenus en IFI. 4B6 est spécifique de l'oocyste sporulé :

- la paroi interne de l'oocyste et la paroi externe du sporocyste sont fortement reconnues en IFI, plus faiblement en WB. L'accès au site antigénique en IF n'est possible qu'après fragmentation des oocystes. En IME, seuls des sporocystes ont pu être observés, confirmant le marquage de leur paroi externe.
- 4B6 reconnaît un ou deux antigènes de haut poids moléculaire (>116 kDa) localisés dans ces structures. Ces antigènes ne sont pas toujours mis en évidence par WB. Leur poids moléculaire élevé pourrait empêcher leur solubilisation, migration et/ou leur transfert complets.

### 2.3.2. Autofluorescence et antigènes reconnus par les AcM ?

#### 2.3.2.1. Résistance des oocystes et autofluorescence

Nos deux anticorps monoclonaux réagissent avec des antigènes localisés pour la plupart dans des structures autofluorescentes.

La résistance de ces structures a été testée en incubant les oocystes avec deux concentrations de NaClO (30 et 60 g/L). Nos résultats confirment la sensibilité de la paroi externe à une solution de 3% de NaClO après 30 min d'incubation. Celle-ci est associée à une



diminution de l'intensité d'autofluorescence (tableau 9, p.85). En revanche, ce type de traitement a peu d'effets sur les antigènes reconnus par les AcM 3G4 et 4B6 situés dans la paroi interne qui n'est pas dégradée par NaClO. D'une manière générale, NaClO, à des concentrations à usage domestique, a peu d'effets sur les antigènes présents dans les parois de l'oocyste de *C. parvum*, encore moins résistant que l'oocyste de *T. gondii* (Rose et al., 1989).

Les antigènes reconnus par les deux AcM semblent particulièrement résistants à de telles conditions oxydatives. Les bases biochimiques de cette résistance pourraient ressembler à celle de la paroi de l'oocyste d'*E. maxima* qui contient des structures antigéniques possédant des résidus tyrosine participant au processus de rigidification de la paroi (Belli et al., 2003).

L'acquisition de cette fluorescence naturelle apparaît pendant le développement de la paroi de l'oocyste, car le macrogamète de toxoplasme, comme celui d'*Eimeria maxima*, n'est pas autofluorescent (Belli et al. (2003). L'observation de coupes d'intestin de chat sous UV ne permet pas d'identifier les oocystes intraépithéliaux fluorescents, probablement en raison d'une modification de leurs propriétés spectrales par les agents d'inclusion. Les modèles de développement de la paroi et de son autofluorescence, proposés chez *E. tenella* et *E. maxima*, suggèrent une protéolyse de certaines protéines contenues dans les WFB, puis leur incorporation à la paroi en développement des oocystes, et leur participation à des structures autofluorescentes (Mouafo et al., 2002, Belli et al., 2003, Ferguson et al., 2003). Ces modèles semblent applicables à l'oocyste de toxoplasme.

#### 2.3.2.2. Réactivités croisées et autofluorescence

Les réactivités croisées observées entre plusieurs espèces de coccidies indiquent la conservation de certains antigènes entre les coccidies autofluorescentes. Il doit exister cependant des antigènes spécifiques de la paroi de l'oocyste de toxoplasme, de la même façon que l'AcM 3F2 qui marque initialement la paroi de l'oocyste d'*H. hammondi*, mais qui ne réagit pas avec celle de toxoplasme (Riahi et al., 2000).

L'absence de marquage de la paroi de l'oocyste de cryptosporidies pourrait signifier que nos deux AcM ne réagissent pas avec l'antigène *TgOWP1*, homologue des protéines de la paroi externe de l'oocyste de *C. parvum* (ou protéines COWP) (Templeton et al., 2004).



### 2.3.3. Conclusion

*Au final, les AcM 3G4 et 4B6 reconnaissent des antigènes présents surtout dans les structures autofluorescentes de l'oocyste (parois de l'oocyste et du sporocyste). 3G4 reconnaît des structures de l'oocyste non sporulé et sporulé. Au contraire, 4B6 est spécifique de la paroi interne de l'oocyste sporulé et de la paroi du sporocyste.*

*La nature précise de ces antigènes n'a pu être déterminée au cours de cette étude. Ces antigènes semblent être partagés par d'autres coccidies phylogénétiquement proches.*

*Les études antigéniques entreprises doivent être complétées et étendues à :*

- *la caractérisation des antigènes reconnus par les AcM 3G4 et 4B6*
- *l'analyse de la composition antigénique et biochimique de la paroi de l'oocyste*
- *l'étude des réactivités croisées avec les tachyzoïtes et bradyzoïtes (pour l'AcM 3G4)*
- *l'étude des réactivités croisées avec d'autres coccidies d'importance médicale ou vétérinaire*

*Ces travaux permettraient de préciser le processus d'oocystogenèse.*

### 3. Développement des méthodes de recherche des oocystes dans l'eau

*Cette partie décrit les phases de développement de la séparation immunomagnétique (IMS) des oocystes de toxoplasme en utilisant les deux anticorps monoclonaux produits précédemment. Une partie de ce développement a été publiée (Dumètre et Dardé, 2005).*

*Nous avons dans un premier temps développé une IMS avec l'AcM 3G4. Cet anticorps n'est cependant pas approprié pour une séparation des oocystes en conditions turbides. C'est pourquoi, nous avons développé par la suite une IMS avec l'AcM 4B6.*

*La faisabilité de l'IMS-4B6 a été appliquée à la détection d'oocystes dans des eaux expérimentalement contaminées.*

#### 3.1. Développement d'une IMS avec l'AcM 3G4

##### 3.1.1. Billes et aimants

Les billes commercialisées sont généralement en polystyrène et renferment une quantité variable de particules ferriques magnétiques (Safarik et Safarikova, 1999). La taille des billes et le processus d'immobilisation des molécules spécifiques du type cellulaire à purifier sont les deux paramètres les plus importants à considérer dans le développement d'une IMS. La surface des billes est sensibilisée en recouvrant le polystyrène par des groupements chimiques capables d'engager des liaisons covalentes avec des protéines, comme les immunoglobulines (Olsvik et al., 1994) (figure 20), ou avec des sucres. Le diamètre des billes est fonction de l'application et de la taille de la cellule à purifier. Les billes de 1 à 5  $\mu\text{m}$  permettent de séparer la plupart des microorganismes de 1 à 10  $\mu\text{m}$ .

Dans notre étude, deux types de billes sont utilisés en fonction de la méthode de capture (cf. paragraphe 3.1.3.). Ces billes sont paramagnétiques, c'est-à-dire qu'elles ont des

propriétés magnétiques uniquement en présence d'un champ magnétique externe (aimant). Les aimants (MPC-L et MPC-S) sont fournis par Dynal Biotech (Compiègne).

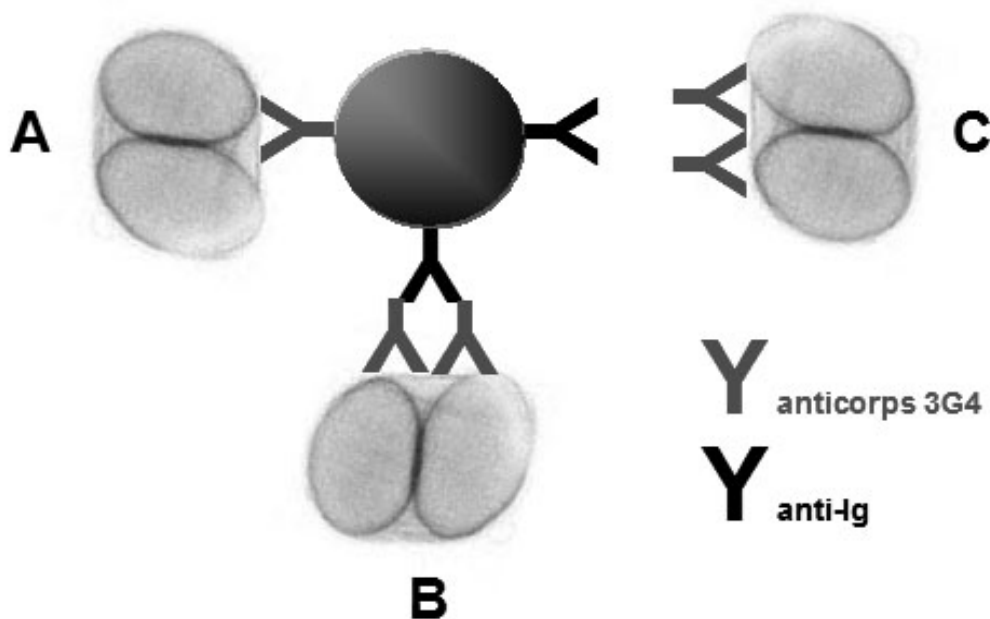
### 3.1.2. Suspensions stocks et numération des oocystes

Les oocystes, conservés en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> à 2%, sont lavés puis concentrés à 10<sup>5</sup>/ml d'eau distillée. Une suspension, conservée à 4°C, est utilisée pendant 1 mois. Pour affiner la numération, six à dix aliquots de 10 µl (soit ~1000 oocystes) sont comptés au microscope sous UV. Pour obtenir des doses de 100 ou 10 oocystes, la même méthode est utilisée (*n*=10 numérations).

### 3.1.3. Méthodes de capture des oocystes

Trois grandes méthodes de capture existent (Olsvik et al., 1994) :

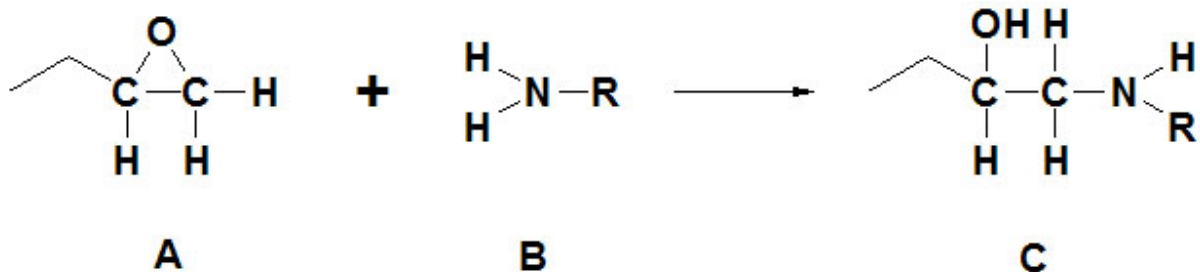
- les méthodes directes : l'oocyste est capté par des billes recouvertes de l'anticorps primaire (figure 19A) ou via une anti-Ig (figure 19B)
- la méthode indirecte : l'oocyste réagit dans un premier temps avec l'anticorps spécifique puis ce complexe est capté par une bille recouverte d'une anti-Ig (figure 19C)



**Figure 19 : Trois approches pour séparer l'oocyste de toxoplasme par IMS** (adapté de Olsvik et al., 1994). L'oocyste est capté par une bille recouverte d'anticorps 3G4 (A) ou via une anti-Ig (B). L'anticorps 3G4 peut aussi réagir dans un premier temps avec l'oocyste puis ce complexe est capté par une bille recouverte d'une anti-Ig (C).

### 3.1.3.1. Méthode directe (A)

Pour cette méthode, nous utilisons des billes Dynal M-450 Epoxy (Dynal Biotech, Compiègne) d'un diamètre de 4,5  $\mu\text{m}$ . Elles sont recouvertes de groupements époxy qui permettent de lier une protéine selon la réaction suivante :



**Figure 20 : Réaction de fixation d'une immunoglobuline sur un groupement époxy.** Un groupement époxy (A) peut former une liaison amine covalente (C) avec l'extrémité N-terminale de n'importe quelle protéine (par exemple une immunoglobuline) (B).

Pour le couplage, les surnageants de culture de l'hybridome 3G4 ne sont pas utilisés tels quels car ils contiennent, en plus de l'anticorps d'intérêt, de nombreuses immunoglobulines provenant du sérum de veau foetal qui pourraient se fixer anarchiquement aux billes. L'hybridome 3G4 est alors cultivé dans un milieu sans protéines (milieu PHFM II, Invitrogen). La concentration en anticorps 3G4 est déterminée par méthode ELISA (paragraphe 2.1.3.7.) et le couplage est effectué selon le protocole fourni par Dynal (annexe 12).

Les billes ainsi coatées sont incubées avec une quantité importante d'oocystes pour faciliter les interactions billes-oocystes :

- dans un microtube de 1,5 ml, 50 µl de billes sont incubés avec  $5.10^4$  à  $2.10^6$  oocystes sous un volume de 500 µl de PBS contenant 0,1% de BSA (pH 7.2). Cette suspension est agitée (rotation de 4 rpm) pendant 30 min à température ambiante (20-25°C)
- le tube est placé contre un aimant (MPC-S) pendant 2 min et le surnageant est aspiré délicatement
- les billes sont reprises dans 500 µl de PBS et la suspension est observée au microscope sous excitation UV (x200) afin d'évaluer la proportion d'oocystes fixés aux billes. La proportion d'oocystes non retenus par les billes est également évaluée par la même méthode.

Malgré ces conditions favorables, le rendement de récupération est seulement de 10% après 30 min d'incubation. La diminution de la température d'incubation (4°C), l'augmentation de la durée d'agitation (30 min → toute la nuit) et la modification du type d'agitation n'améliorent pas ce rendement. Les billes Dynal ont été rapidement abandonnées au profit de billes pré-coatées avec une anti-IgM qui ont donné de meilleurs rendements.

### 3.1.3.2. Méthode directe via une anti-IgM (B)

Nous avons choisi des billes d'un diamètre de 0,86 µm recouvertes d'un anticorps de chèvre anti-IgM de souris (BM0829, P.A.R.I.S., Compiègne). Leur diamètre inférieur à celui des billes Dynal permet d'obtenir, à volume égal, une concentration plus élevée de billes, augmentant ainsi les possibilités d'interaction avec les oocystes. Le couplage de l'anticorps 3G4 est réalisé selon le protocole fourni par P.A.R.I.S. (annexe 13).

Après quelques essais préliminaires avec des quantités importantes d'oocystes, l'IMS est développée pour un inoculum de  $10^3$  oocystes. Ces conditions se rapprochent de la prévalence naturelle des oocystes qui est probablement assez faible dans un échantillon d'eau prélevé aléatoirement. La séparation des oocystes est réalisée dans un microtube de 1,5 ml :

- 25 µl de billes BM0829 pré-coatées avec l'anticorps 3G4 sont ajoutés à 490 µl de tampon d'incubation (PBS-0,05%Tween-20-1%BSA, pH 7.2) et 10 µl de la suspension d'oocystes (~1000 oocystes)

- le mélange est incubé 30 min à température ambiante (20-25°C) sous agitation rotatoire douce (4 rpm)
- le tube est placé contre un aimant (MPC-S) pendant 2 min et le surnageant est aspiré délicatement
- les billes sont reprises dans 200 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> à 2% puis vortéxées pendant 3 min à vitesse maximale. Le tube est placé en position verticale pendant 10 min puis est vortéxé à nouveau pendant 3 min.
- le tube est placé contre l'aimant MPC-S pendant 2 min. Le surnageant est aspiré et les oocystes sont comptés au microscope sous UV (x200)

### 3.1.3.3. Méthode indirecte (C)

Comme pour la méthode précédente, les essais sont réalisés dans des tubes de 1,5 ml :

- 10<sup>3</sup> oocystes sont incubés dans un premier temps avec 0,45 µg de 3G4 dans un volume final de 500 µl dans les mêmes conditions que précédemment
- 25 µl de billes BM0829 sont ajoutés après 30 min et le mélange est incubé pendant 30 min supplémentaires à 4 rpm à température ambiante
- les billes sont séparées et les oocystes sont élués dans une solution d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> à 2% comme décrit ci-dessus
- les oocystes sont comptés sous UV (x200)

### 3.1.4. Résultats

#### 3.1.4.1. Comparaison méthode B / méthode C

Les billes P.A.R.I.S. BM0829 capturent les oocystes sporulés et non sporulés quelque soit la méthode, mais seulement en présence de l'anticorps 3G4. La figure 21 montre la fixation des billes sur des oocystes après 30 min d'incubation. Un nombre important de billes (>50) semble nécessaire pour capturer un seul oocyste. L'autofluorescence des oocystes facilite leur repérage parmi les billes (figure 21C). Les rendements de purification d'oocystes

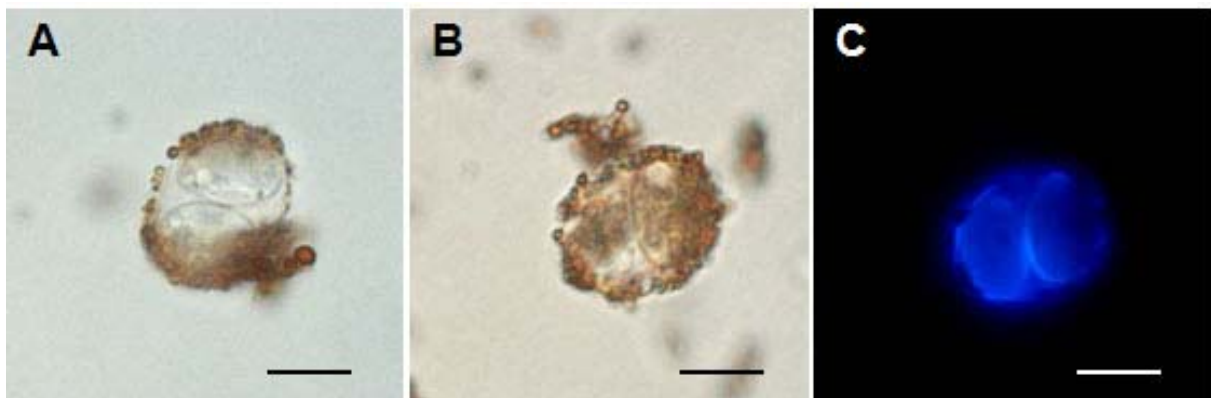
sont de  $25,2 \pm 2,0$  % avec la méthode directe (B) et de  $69,4 \pm 8,1$ % avec la méthode indirecte (C) (tableau 11). La méthode indirecte est retenue par la suite pour être optimisée.

### 3.1.4.2. Optimisation de l'incubation

Deux paramètres sont modifiés : la température et la composition du tampon d'incubation. D'une part, la température influence la fixation d'un anticorps à son antigène, les températures élevées ( $37^{\circ}\text{C}$ ) favorisant des réactions moins spécifiques qu'à  $4^{\circ}\text{C}$  (Vesey et al., 1997). D'autre part, un tampon doit contenir des agents bloquants (ex. BSA) pour minimiser les fixations non spécifiques. Deux tampons sont testés en plus du tampon PBS-0,05%Tween-20-1%BSA initialement utilisé (ou tampon 1, pH 7,2) :

- le tampon 2 est du PBS contenant 0,01% de Tween-80 et 0,01% d'Antifoam-A (pH 7,2) (AFNOR, 2001 ; USEPA, 2001).
- le tampon 3 (pH 7,2) est composé des tampons Dynal SL-A et SL-B dilués au 1/10 dans l'ED. Ces tampons font partie du kit de détection des cryptosporidies et des giardias par IMS (kit Dynabeads GC-Combo IMS, Dynal biotech.). Leur composition ne nous a pas été communiquée.

Le tableau 12 montre les rendements de récupération obtenus selon la température et le tampon d'incubation après méthode indirecte. Un résultat optimal est obtenu avec le tampon 1 à  $37^{\circ}\text{C}$ , pour lequel  $82,8 \pm 4,7$ % des oocystes sont récupérés après élution.



**Figure 21 : Fixation des billes P.A.R.I.S. BM0829 sur des oocystes sporulés de toxoplasme (A,B) après IMS avec l'AcM 3G4. (C) Oocyste de la photo B observé sous UV. Echelle = 5  $\mu\text{m}$ . x1000.**

Méthodes d'IMS	Rendement de récupération (%) (moyenne $\pm$ S.D.)
Directe (B) ( $n=3$ )	25,2 $\pm$ 2,0
Indirecte (C) ( $n=3$ )	69,4 $\pm$ 8,1

**Tableau 11 : Rendement des méthodes directe (B) ou indirecte (C) d'IMS-avec l'AcM 3G4 et  $10^3$  oocystes de toxoplasme.**

Température (°C)	Tampon 1		Tampon 2		Tampon 3
	Non turbides	Turbides	Non turbides	Turbides	Non turbides
4 ( $n=3$ )	66,6 $\pm$ 7,2	22,2 $\pm$ 3,5	NF <sup>a</sup>	NF	NF
20-25 ( $n=3$ )	69,4 $\pm$ 8,1	24,3 $\pm$ 1,2	64,8 $\pm$ 8,4	17,3 $\pm$ 1,6	44,6 $\pm$ 12,3
37 ( $n=3$ )	82,8 $\pm$ 4,7	NF	66,6 $\pm$ 3,1	NF	NF

<sup>a</sup>NF, non fait

**Tableau 12 : Rendement (en %) de la méthode indirecte (C) d'IMS avec l'AcM 3G4 et  $10^3$  oocystes de toxoplasme, en fonction de la température et du tampon d'incubation.** <sup>a</sup>

NF, non fait.

Age des oocystes	Solutions de dissociation	
	0,1 N HCl	2% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
1 mois ( $n=3$ )	NF <sup>a</sup>	82,9 $\pm$ 12,8
12 mois ( $n=3$ )	17,4 $\pm$ 4,5	82,8 $\pm$ 4,7

**Tableau 13 : Rendement (en %) de la méthode indirecte d'IMS avec l'AcM 3G4 et  $10^3$  oocystes de toxoplasme, en fonction du temps de conservation initiale des oocystes et de la méthode de dissociation.** <sup>a</sup> NF, non fait.



### 3.1.4.3. Optimisation de l'élution des oocystes

Deux méthodes d'élution acide des oocystes sont testées. La méthode *USEPA 1623 / AFNOR T90-455* recommande une élution des oocystes de *Cryptosporidium* sp. et des kystes de *Giardia intestinalis* par HCl 0,1N (AFNOR, 2001 ; USEPA, 2001). Le même protocole est appliqué au toxoplasme :

- $10^3$  oocystes sont séparés par méthode indirecte comme décrit ci-dessus (3.1.3.3.)
- les billes sont reprises avec 50  $\mu$ l d'HCl 0,1N et vortexées pendant 15 sec. Le tube est placé en position verticale pendant 10 min puis est vortexé à nouveau pendant 10 sec
- le surnageant est aspiré et neutralisé avec 5  $\mu$ l de NaOH 1N

Cette méthode nous a permis d'éluer seulement  $17,4 \pm 4,5\%$  des oocystes fixés aux billes (tableau 13). Quelques essais supplémentaires ont montré que ce pourcentage n'est pas amélioré pour un volume d'HCl porté à 100  $\mu$ l et une agitation plus longue de 2x1 min. En revanche dans les mêmes conditions, une amélioration sensible est apportée quand cette solution est remplacée par une solution d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> à 2%. Cette deuxième méthode a été optimisée (cf. paragraphe 3.1.3.2.) et permet l'élution d'environ 80% d'oocystes (tableau 13).

### 3.1.4.4. Influence de l'âge des oocystes

La persistance des oocystes dans les matrices environnementales est importante (plusieurs mois) et les populations d'oocystes sont probablement hétérogènes en âge. Il est donc nécessaire de disposer d'une IMS détectant tous les oocystes quelque soit leur âge.

Deux suspensions d'oocystes conservées en acide sulfurique 1 ou 12 mois sont testées. Le tableau 13 montre que la méthode indirecte a un rendement de récupération identique quelque soit la durée de conservation des oocystes ( $82,9 \pm 12,8\%$  et  $82,8 \pm 4,7\%$  respectivement).

### 3.1.4.5. IMS en conditions turbides

Pour évaluer l'influence de la turbidité sur l'IMS, des débris sont ajoutés directement dans un volume final de 500  $\mu$ l de tampons 1 ou 2 dans un rapport 1/20 (v/v) respectivement. (Hsu et Huang, 2001). Les débris sont concentrés à partir de quelques litres d'une eau de

rivière filtrée sur membrane de nitrocellulose (porosité de 3  $\mu\text{m}$ ). Environ  $10^3$  oocystes sont ajoutés dans le microtube puis sont séparés par méthode indirecte, comme décrit ci-dessus (3.1.3.3.).

Le tableau 12 montre une diminution du rendement en conditions turbides, de  $66,6 \pm 7,2\%$  à  $22,2 \pm 3,5\%$  à  $4^\circ\text{C}$  et de  $69,4 \pm 8,1\%$  à  $24,3 \pm 1,2\%$  à température ambiante (tampon 1). La même diminution est observée après incubation dans le tampon 2, de  $64,8 \pm 8,4\%$  à  $17,3 \pm 1,6\%$ . La fraction d'oocystes élués après IMS contient encore beaucoup de débris organiques et inorganiques, quelque soit la température d'incubation. Leur présence est bien due à une fixation non spécifique de 3G4 aux débris car aucune réactivité n'est observée avec des billes BM029 incubées en l'absence de 3G4.

### 3.1.5. Discussion

L'IMS est une technique spécifique et sensible qui permet la détection des microorganismes les plus prévalents dans les aliments, dans l'eau ou le sol comme *Escherichia coli*, *Cryptosporidium* sp. et *Giardia intestinalis* (Safarik et Safarikova, 1999).

Nous décrivons ici pour la première fois deux méthodes d'IMS des oocystes de toxoplasme. Cette méthode a été développée avec l'AcM 3G4 car celui-ci, dirigé contre la paroi externe des oocystes, paraissait le plus approprié. Avec cet anticorps, seule une méthode indirecte permet la capture d'environ 80% d'oocystes sporulés ou non sporulés. Deux hypothèses peuvent expliquer la supériorité de cette méthode :

- la méthode indirecte est généralement utilisée lorsque la méthode directe ne donne pas de bons résultats, notamment si l'antigène est faiblement représenté à la surface du type cellulaire à purifier (Safarik et Safarikova, 1999). 3G4 marque uniformément la paroi de l'oocyste en IFI, ce qui laisse penser à une représentation homogène de l'antigène dans la paroi.
- une seconde hypothèse est qu'un anticorps 3G4 « libre » se fixe plus facilement à la surface de l'oocyste qu'un anticorps 3G4 lié à une bille magnétique. Les IgM 3G4 « libres » peuvent saturer les sites antigéniques contrairement aux 3G4 liées aux billes. L'encombrement stérique des complexes bille-antiIgM-3G4 pourrait diminuer l'accès à l'antigène.

L'IMS-3G4 des oocystes de toxoplasme a été mise au point en conditions non turbides, en ajoutant un faible nombre d'oocystes juste avant séparation. Ces conditions ne reflètent pas les conditions naturelles dans lesquels les débris organiques peuvent réagir de manière non spécifique avec l'anticorps et les billes magnétiques (Rodgers et al., 1995). L'utilisation du 3G4 en conditions turbides montre que cet anticorps n'est pas très spécifique de l'oocyste de toxoplasme : une observation microscopique des suspensions d'oocystes après IMS montre la présence de nombreux débris co-élués. Cet anticorps est une IgM, pour laquelle dix sites de liaison à l'antigène existent. Les IgM créent plus facilement des liaisons non spécifiques que des IgG (Vesey et al., 1997). Ces réactions sont souvent éliminées en incorporant des agents bloquants et des détergents doux (Rodgers et al., 1995), en diminuant la température d'incubation ou en utilisant des anticorps IgG (Vesey et al., 1997). Dans notre étude, la modification de ces paramètres d'incubation n'améliore pas la capture des oocystes. L'augmentation du volume de réaction et de la durée d'incubation peuvent aussi améliorer la séparation, mais des essais ont montré que ces conditions ne sont pas adaptées à la méthode indirecte. L'IMS en conditions turbides dépend aussi d'autres paramètres qui n'ont pas été évalués ici : turbidité, pH et concentration en ions ferriques des eaux analysées (Bukhari et al., 1998 ; Di Giovanni et al., 1999 ; Yakub et Stadterman-Knauer, 2000 ; Kuhn et al., 2002). L'IMS est parfois inappropriée pour la détection des oocystes de *Cryptosporidium parvum* dans des eaux fortement turbides car les débris interagissant avec les oocystes empêchent l'accès des billes aux antigènes (Bukhari et al., 1998 ; Di Giovanni et al., 1999).

Si l'anticorps 3G4 est peu spécifique de l'oocyste de toxoplasme, son affinité semble en revanche assez forte. La méthode classique d'élution des cryptosporidies et des giardias (AFNOR, 2001 ; USEPA, 2001) est peu efficace sur les oocystes de toxoplasme. En remplaçant l'HCl 0,1 N par une solution d'acide sulfurique à 2% (0,6 N) et en augmentant la durée d'agitation des billes, environ 80% des oocystes sont élués. L'acide sulfurique cède un proton de plus que l'acide chlorhydrique et ses protons entraînent la rupture des liaisons hydrogènes antigène-3G4-antiIgM. Une solution de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> à 2% est tout à fait appropriée pour l'élution des oocystes de toxoplasme étant donné la persistance de l'infectiosité des oocystes dans ce type de solution (Dubey et Beattie, 1988). Une élution des oocystes de *C. parvum* à 80°C pendant 10 min peut remplacer les solutions acides (Ware et al., 2003), mais cette méthode n'est pas appropriée pour des tests de viabilité car les oocystes de toxoplasme sont rapidement tués à partir de 60°C (cf. partie 1, paragraphe 3.1.1.).

Notre méthode d'IMS avec l'AcM 3G4 permet la séparation de 80% d'oocystes d'âge variable (jusqu'à 12 mois de conservation). Ceci est important car la durée de survie des oocystes en conditions naturelles est grande. Des résultats similaires sont rapportés après IMS de kystes de *G. intestinalis* et d'oocystes de *C. parvum* conservés respectivement 8 et 20 mois, même si une baisse non significative du pourcentage de récupération est observée (Bukhari et al., 1998 ; McCuin et al., 2001). Il semble que les conditions oxydatives rencontrées par les oocystes de toxoplasme au cours de leur purification et de leur conservation en acide sulfurique ont peu d'effets sur les épitopes reconnus par l'anticorps 3G4. Cette caractéristique a été montrée par les études antigéniques en IFI (paragraphe 2.2.1.).

***Au final :***

- ***l'anticorps monoclonal 3G4 est adapté pour l'analyse par IMS d'eaux non turbides (eau de consommation) mais la pertinence d'une telle application est discutable.***
- ***en revanche, elle est inapplicable aux eaux de surface où peuvent se rencontrer plus logiquement les oocystes de toxoplasme, étant donné la réactivité de 3G4 avec les débris environnants.***
- ***cet échec est décevant puisque 3G4 est le seul anticorps qui réagit contre les oocystes intacts sporulés et non sporulés.***
- ***une IMS avec l'anticorps 4B6 a donc été développée et appliquée à la détection du toxoplasme dans des eaux expérimentalement contaminées.***

## 3.2. Développement d'une IMS avec l'AcM 4B6

### 3.2.1. Optimisation de l'IMS-4B6

Cette IMS nécessite une fragmentation préalable des oocystes sporulés afin de rendre les sporocystes accessibles à l'anticorps 4B6. Une fragmentation optimale doit libérer un maximum de sporocystes sans les détruire.

Pour cela, des suspensions non turbides ( $n=6$ ) contenant  $98,4 \pm 10,3$  oocystes sporulés dans 2 ml de PBS (à 4°C) sont soniquées avec un Branson Sonifier 250 équipé d'une tige de 3 mm de diamètre. Après quelques essais préliminaires, le protocole suivant permet d'obtenir  $90,3 \pm 10,3\%$  de sporocystes intacts :

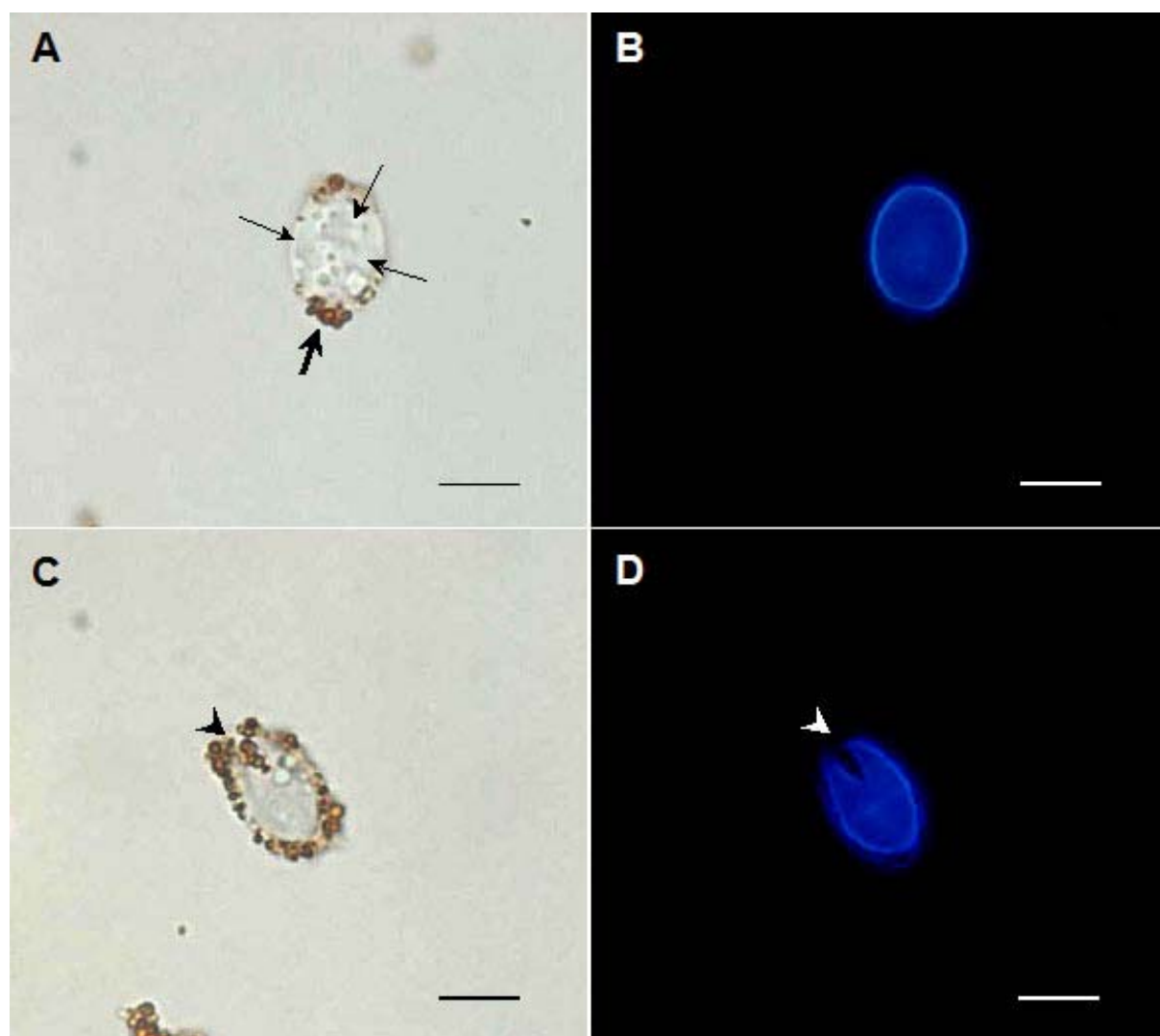
- dans de la glace, la suspension d'oocystes est soumise à une sonication de 10 secondes à 15 W, toutes les 10 secondes, pendant 3 minutes et 10 secondes (soit un total de 10 sonications).
- la tige est rincée avec quelques millilitres de PBS (à 4°C) et la suspension est centrifugée à 1200 g, pendant 10 min.
- les sporocystes sont numérisés par microscopie sous UV

La fragmentation de la totalité des oocystes sporulés est impossible à obtenir car certains oocystes semblent particulièrement résistants aux ultrasons. Si la dose ou le temps de sonication sont augmentés, les sporocystes se cassent et des sporozoïtes libres sont observés. L'augmentation de la température au cours de la sonication n'est pas délétère pour les sporozoïtes. La température finale de la suspension peut atteindre 37-40°C mais celle-ci est rapidement abaissée à 20-25°C par l'ajout de PBS à 4°C. Des suspensions d'oocystes soniqués suivant ce protocole induisent une toxoplasmose chez la souris, même si ce genre de bio-essai est peu informatif puisqu'il suffit d'un sporocyste viable pour entraîner l'infection.

Sur le modèle développé avec l'anticorps 3G4, des essais préliminaires sont conduits pour vérifier la faisabilité d'une IMS-4B6. La méthode directe (méthode B dans le paragraphe 3.1.3.2.) permet la récupération de 80% des sporocystes, dans un volume d'incubation de 10

ml (contre 0,5 ml pour une IMS-3G4), ce qui a pour effet de diminuer les interactions billes-débris.

Les billes P.A.R.I.S. BM0829 capturent les sporocystes intacts (figures 22A et 22B) ou fragmentés (figures 22C et 22D) mais aussi les parois libres d'oocystes dont la face interne est accessible à 4B6. Les oocystes intacts ou ceux dont la paroi interne n'est pas correctement exposée ne sont pas reconnus. Les parois libres qui sont capturées ne sont pas observées dans la suspension finale de sporocystes car elles semblent être détruites pendant l'élution. Après élution, les sporocystes peuvent être détectés par IFI-4B6. Cela confirme la persistance des structures antigéniques reconnues par 4B6 après élution en conditions acides.



**Figure 22 : Fixation des billes P.A.R.I.S. BM0829 sur des sporocystes de toxoplasme après 30 min d'IMS avec l'AcM 4B6.** (A,B) Capture par le pôle d'un sporocyste intact (flèche épaisse) ; 3 sporozoïtes sont visibles à l'intérieur (flèches). (C,D) Sporocyste dont la paroi est ouverte (tête de flèche), fixation particulière au niveau de l'ouverture. Echelle = 5  $\mu$ m. x1000. B et D, observées sous UV.

### 3.2.2. Application à la détection dans des eaux expérimentalement contaminées

#### 3.2.2.1. Origine des échantillons d'eaux et contamination expérimentale

Trois types d'eaux sontensemencés avec des oocystes :

- l'eau déminéralisée, de très faible turbidité (0,03-0,07 NTU), sert de contrôle. Elle est produite au CHU de Limoges. La prise s'effectue au robinet, dans le laboratoire.
- l'eau de consommation (<0,3 NTU) est l'eau potable produite par la ville de Limoges. La prise a lieu en sortie de la station municipale de traitements des eaux, ou au robinet, dans le laboratoire.
- les eaux de surface sont plutôt de faibles turbidités (2,72-10,86 NTU). Elles sont collectées à l'entrée de la station municipale, ou sur le cours urbain de l'Auzette, petit affluent de la Vienne.

La turbidité de chaque échantillon est mesurée par un turbidimètre (TN-100, Eurotech Instruments). Le pH et la température sont mesurés par un pH mètre (HI931000, Hanna Instruments).

Dans un container en plastique, dix litres d'eau sontensemencés avec environ  $10^4$  oocystes sporulés, soit  $1$  à  $10^3$  oocystes / L. Un temps de 15 min est observé avant la filtration. Après chaque filtration, les containers et tubulures sont mis en contact avec de l'eau chaude (100°C), puis toute la nuit dans une solution détergente et bactéricide (Hexanios, laboratoire Anios, Lille) pendant 24 h, et sont finalement rincés avec de l'eau déminéralisée avant d'être séchés.

#### 3.2.2.2. Filtration et élution

Les échantillons sont filtrés sur capsule Gelman Envirochek™ standard (GES, porosité de 1 µm) avec une pompe Masterflex (Fisher Bioblock) à un débit maximal de 0,7 L/min. Les containers sont rincés avec 200 ml du tampon d'élution et cette solution est filtrée. Les oocystes sont élués de la capsule par un tampon PET qui contient 0,01% de Tween-80, 0,02% de pyrophosphate de sodium et 0,03% d'EDTA. Ses propriétés éluantes sont supérieures à



celles des tampons utilisés pour la recherche normalisée des cryptosporidies dans l'eau (Inoue et al., 2003).

La méthode d'éluion est adaptée de celle de l'USEPA 1623 (USEPA, 2001). Elle a lieu en deux étapes :

- 100 ml de tampon PET sont introduits dans la capsule
- un temps de contact de 2x15 min est observé, la capsule en position verticale, orifice d'entrée vers le haut (15 min), puis vers le bas (15 min)
- cette solution est éluee dans un tube à centrifuger
- 100 ml de tampon PET sont introduits dans la capsule et celle-ci est agitée latéralement sur une table à vitesse maximale (280 agitations/minute) pendant 15 min. Puis la capsule est retournée et agitée 15 min supplémentaires.
- cette deuxième solution est ajoutée à la première
- la capsule est vortexée pour récupérer le maximum d'éluat
- l'éluat est centrifugé à 1250 g pendant 30 min à 4°C (sans frein)

### 3.2.2.3. IMS et microscopie

- le culot de centrifugation ( $\leq 0,25$  ml ) est repris dans un volume final de 2 ml dans le tampon d'incubation PBS-1%BSA-0,05%Tween-20.
- la suspension est soniquée comme décrit précédemment et transférée dans un tube de Leighton. Le volume est complété à 10 ml avec le tampon d'incubation.
- 100  $\mu$ l de billes P.A.R.I.S. BM0829, recouvertes préalablement de l'anticorps 4B6 (annexe 13), sont ajoutés et le mélange est incubé pendant 30 min à 4 rpm.
- les billes sont aimantées pendant 5 min par un aimant MPC-L (Dynal Biotech) et le surnageant est retiré

- les billes sont reprises dans 1 ml de tampon d'incubation et aimantées pendant 2 min comme décrit dans le paragraphe 3.1.3.2.. Un lavage des billes avec 1 ml de tampon est réalisé pour les eaux de surface.
- les oocystes sont élués par 200  $\mu$ l d' $H_2SO_4$  à 2% comme décrit précédemment.

#### 3.2.2.4. Résultats

La capsule GES a permis de filtrer sans colmatage tous les prélèvements quelque soit leur turbidité. Après filtration et IMS, des sporocystes sont détectés dans 13/14 échantillons surchargés, quelque soit l'inoculum (tableau 14). La teneur en débris est minimale dans la suspension finale de sporocystes. Le rendement est plus élevé pour des eaux non turbides (eau distillée et eau de boisson, jusqu'à 0,29 NTU). Dans ces échantillons, il est possible de détecter environ la moitié de très faibles inoculums (1 et 10 oocystes/L).

L'analyse d'eaux de surface montre un rendement de 17,8% à 32,5% pour un inoculum de 10 oocystes/L. Ce pourcentage n'est pas amélioré avec des inoculums plus importants. L'influence de la turbidité sur cette méthode ne peut pas être déterminée clairement étant donné le petit nombre d'expérimentations.

Nombre d'oocystes sporulés / 10 L (nombre équivalent en sporocystes)	Nombre d'oocystes sporulés / L	Type d'eau	Turbidité (NTU)	pH	Nombre de sporocystes comptés par microscopie	Rendement (%)	
9,4 ± 3,4 (18,8 ± 6,7)	<b>1</b>	<b>Eau déminéralisée</b>					
		CHU	0,05	5,49	12	63,8	
		CHU	0,05	5,49	9	47,9	
		<b>Eau de surface</b>					
		Auzette	8,67	7,43	0	0	
98,4 ± 10,3 (196,8 ± 20,6)	<b>10</b>	<b>Eau déminéralisée</b>					
		CHU	0,03	5,45	92	46,7	
		CHU	0,07	5,45	123	62,5	
		<b>Eau potable</b>					
		Station municipale	0,08	8,20	88	44,7	
		Robinet (CHU)	0,29	8,16	59	30,0	
		<b>Eau de surface</b>					
		Auzette	10,86	7,24	35	17,8	
		Auzette	5,16	7,30	64	32,5	
		Station municipale	2,72	6,47	57	29,0	
984,0 ± 103,2 (1967,8 ± 206,5)	<b>100</b>	<b>Eau de surface</b>					
		Auzette	8,50	7,24	680	34,6	
		Station municipale	2,85	6,43	163	8,3	
9838,8 ± 1032,4 (19677,6 ± 2064,8)	<b>1 000</b>	<b>Eau de surface</b>					
		Auzette	9,92	7,33	3600	18,3	
		Auzette	10,26	7,30	5331	27,1	

**Tableau 14 : Rendement de récupération de sporocystes après filtration et IMS-4B6 d'eaux expérimentalement contaminées.**

### 3.2.3. Discussion

Les techniques classiques d'IMS sont basées sur la reconnaissance des protozoaires dans leur intégralité, sans fragmentation préalable. La purification des sporozoïtes de toxoplasme par IMS paraît inappropriée car elle serait trop dépendante du rendement du dékystement et de la turbidité des échantillons. En revanche, l'IMS des sporocystes présente plusieurs avantages :

- après sonication, la surface des sporocystes est très accessible aux billes, car peu de débris d'origine hydrique y adhère.
- l'extraction d'ADN est facilitée par l'élimination de la paroi de l'oocyste.

La principale difficulté est d'obtenir un rendement homogène de sporocystes intacts après sonication, quelque soit la quantité et la qualité du culot de filtration. Le rendement de la sonication influence directement l'IMS ce qui peut expliquer les différences observées dans les pourcentages de récupération pour un même inoculum (tableau 14). En pratique, le protocole de sonication est adapté pour un culot  $\leq 0,25$  ml dilué dans un volume final de 2 ml. Les culots plus importants sont aliquotés sous 0,25 ml. La sonication est pour l'instant la seule méthode physique efficace pour libérer massivement les sporocystes (Freyre et Falcon, 2004).

L'IMS-4B6 détecte 1 oocyste/L en conditions non turbides et 10 oocystes/L d'eaux de boisson ou de surface. Elle permet une bonne séparation des oocystes des débris organiques et inorganiques présents dans les eaux de surface avec un minimum de débris résiduels dans la suspension finale. Villena et al. (2004) détectent 1 oocyste/L en conditions non turbides et 100/L dans des eaux de surface, par flottation sur saccharose-phénol, PCR et inoculation à la souris. Il est évident que la turbidité diminue le seuil de détection mais il existe deux différences principales entre les deux études :

- les volumes d'eauxensemencés sont plus importants dans l'étude de Villena et al. (2004) : 100 L pour les eaux non turbides et 40 L pour les eaux de surface (contre 10 L dans notre étude). Etant donné la faible densité des oocystes dans un prélèvement pris aléatoirement, les toxoplasmes doivent être recherchés dans le plus grand volume possible. Cependant, cela pose un problème quand on veut évaluer une méthode de

concentration comme la nôtre car la répartition des protozoaires dans l'eau n'est pas homogène. Le volume devient alors un paramètre critique pour déterminer le rendement de récupération (DiGiorgio et al., 2002). La filtration de faibles volumes (10 L) permet de diminuer l'influence de ce paramètre.

- la deuxième différence concerne le mode de mise en évidence des toxoplasmes après l'étape de purification. Les toxoplasmes purifiés par IMS-4B6 sont quantifiés par microscopie alors que la PCR et l'inoculation à la souris sont des méthodes qualitatives (Villena et al., 2004). Leur positivité peut masquer des rendements de récupération très variables. A titre indicatif, les rendements moyens de récupération des oocystes de *Cryptosporidium parvum* par la méthode AFNOR NFT90-455 sont de 41,3% et 56,1%, respectivement à partir d'eau potable contenant 1 oocyste/L et à partir d'eaux de surface contenant 10 oocystes/L. Dans cette méthode, le nombre d'oocystes de *C. parvum* concentrés par IMS est déterminé par immunofluorescence.

### 3.3. Conclusion

*Nous avons développé une méthode de recherche des oocystes de toxoplasme dans l'eau par filtration, élution, sonication et IMS en utilisant l'anticorps monoclonal 4B6 qui reconnaît spécifiquement la paroi du sporocyste.*

*Cette méthode permet de détecter 1 oocyste/L d'eau non turbide et 10 oocystes/L d'eau faiblement turbide (environ 10 NTU).*

## 4. Prévalence du toxoplasme dans l'environnement et dans des réservoirs animaux soumis à une infection par les oocystes

*Le parasite est recherché dans l'environnement :*

- *dans les eaux de surface pouvant être naturellement contaminées par les oocystes*
- *chez des hôtes bio-indicateurs de la présence d'oocystes dans l'eau ou le sol :*
  - *animaux d'élevage : ovins, bovins et poulets.*
  - *animaux sauvages : le ragondin (rongeur aquatique), d'autres rongeurs, ainsi que des espèces qui permettent une dissémination du parasite à distance (oiseaux).*

### 4.1. Méthodologie

La méthodologie utilisée pour détecter le toxoplasme dans l'eau intègre l'IMS-4B6 développée précédemment. Les cryptosporidies et les *Giardia* sont également recherchées dans certains prélèvements, selon le protocole décrit dans l'annexe 14.

Chez l'animal, l'infection toxoplasmique est mise en évidence par ADHS et le parasite est recherché dans les tissus contaminés par les techniques décrites dans l'annexe 15.

#### 4.1.1. Dans l'eau

##### 4.1.1.1. Stratégies d'échantillonnage

Pour optimiser la détection d'oocystes dans les eaux de surface, des sites de prélèvements ont été sélectionnés en tenant compte d'un ou plusieurs critères :

- présence de points d'eau stagnante de faible surface (bassins, mares, rigoles à faible écoulement) accessibles aux chats et aux hôtes intermédiaires.
- présence régulière de chats (errants et domestiques)
- sites soumis à un ruissellement en périodes de fortes précipitations.
- présence d'animaux infectés par le toxoplasme (notamment troupeaux ovins avec cas récents d'avortements toxoplasmiques).
- tout point d'eau susceptible d'être contaminé et présentant un risque dans la transmission à l'homme et aux animaux.

#### **Cinquante prélèvements ont pu être analysés :**

- **14 proviennent du cours supérieur de la Seine** (entre Paris et l'estuaire). Ils ont été prélevés et soumis à une recherche de cryptosporidies et de *Giardia* en juin et juillet 2002 par le laboratoire de Parasitologie de Rouen (L. Favennec, G. Gargala). A leur arrivée à Limoges, sous forme de culots d'éluion des cartouches de filtration, les prélèvements ont été centrifugés une fois et conservés en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2% jusqu'à IMS (soit une durée de 3 ans).
- **36 proviennent de plusieurs localités de Haute-Vienne et du nord de la Dordogne** (carte A, annexe 16). **La majorité des échantillons a été prélevée de mars à juillet 2005**, après le développement de l'IMS. La recherche des cryptosporidies et des *Giardia* n'a pas été systématique (pour 14/36 prélèvements). Sur certains sites, des prélèvements de sol et de fèces de chats ont été aussi analysés.

#### 4.1.1.2. Méthodologie

Les oocystes sont recherchés dans l'eau par filtration, IMS-4B6 et IFI-4B6 sur la moitié du prélèvement, et si l'IFI est positive, par bio-essai chez la souris et/ou par PCR en temps réel.

***Filtration → IMS → IFI***

Les eaux de surface sont prélevées dans des containers en plastique numérotés qui sont conservés à 2-8°C jusqu'à analyse (au maximum 3 jours). La décontamination des bidons ainsi que des tuyaux de filtration consiste en un choc thermique pour tuer d'éventuels oocystes et un trempage toute la nuit dans une solution détergente et bactéricide (Hexanios, laboratoires Anios, Lille). L'ensemble des analyses est fait au laboratoire. Quelques prélèvements ont pu être filtrés sur site :

- la filtration et l'IMS-4B6 sont effectuées telles que décrites dans le paragraphe 3.2.2..
- dans le cas de prélèvements de forte turbidité (>10-20 NTU), le culot de centrifugation de l'éluat peut atteindre plusieurs millilitres. Une pré-purification par flottation sur une solution de saccharose-phénol (densité 1,15 - annexe 4) est réalisée sur ce culot, suivie ou non de l'IMS.
- la suspension finale obtenue après IMS est neutralisée par un volume égal de NaOH à 3,3% et centrifugée à 1250 g pendant 10 min et repris dans 100 µl d'ED.
- 50 µl du culot sont réservés pour l'IFI.
- l'IFI-4B6 est réalisée comme décrite dans la section précédemment. Une observation de la préparation sous UV est également réalisée.

***Extraction d'ADN***

Si un prélèvement est positif en IFI, l'ADN toxoplasmique est recherché par PCR en temps réel sur 25% de la quantité de prélèvement au départ. L'ADN est extrait des sporocystes selon une méthode adaptée de celle de Zhao et al., 2001 :

- les sporocystes sont lysés toute la nuit dans 60 µl de tampon SDS-EDTA-protéinase K (annexe 17), à 65°C.
- les sporocystes sont lysés dans un deuxième tampon, 350 µl de tampon CTAB (annexe 16) pendant 1 h à 60°C.
- l'ADN est précipité par 410 µl d'éthanol absolu.



- l'ADN est purifié en suivant les instructions fournies dans le QIAamp<sup>®</sup> DNA mini kit (Qiagen, Courtabœuf, France).
- l'ADN est élué sous 50-100 µl de tampon Tris-EDTA

### ***PCR en temps réel***

Le gène AF146527 est la cible recherchée car il est répété 200 à 300 fois dans le génome du toxoplasme (Homan et al., 2000) (annexe 18). Cinq microlitres d'ADN sont ajoutés à 15 µl de mix (annexe 18) dans des capillaires en verre (Roche Diagnostics, Meylan, France) L'amplification d'un fragment de 121 pb est réalisée par un LightCycler (Roche Diagnostics, Meylan, France) :

- dénaturation initiale 2 min à 50°C puis à 95°C pendant 10 min
- 50 cycles d'amplification : 95°C (5 s), 60°C (10 s) et 72°C (15 s) / cycle

Pour chaque prélèvement, l'amplification est effectuée en duplicate et un contrôle interne (ADN équivalent à 20 tachyzoïtes) est également amplifié pour vérifier la présence d'inhibiteurs de PCR dans les ADN extraits. Les résultats sont analysés par le logiciel LightCycler Data Analysis (Roche Diagnostics, Meylan, France).

#### 4.1.2. Dans le sol et les fèces

L'IMS n'est pas utilisée pour la recherche du toxoplasme dans les matrices solides en raison du volume trop important de débris à traiter.

#### ***Pour les prélèvements de sol :***

- un maximum de 100 grammes est agité toute la nuit dans 200 ml de tampon PET
- la solution est filtrée sur un tamis métallique de 500 µm, centrifugée à 1200 g (10 min à 4°C) puis purifiés par flottation sur saccharose-phénol.

#### ***Pour les fèces :***

- ils sont conservés à +4°C jusqu'à analyse. La méthode choisie est la flottation de Janeckso-Urbanyi.

### 4.1.3. Dans les tissus animaux

#### 4.1.3.1. Stratégie d'échantillonnage

Cette stratégie est donnée ci-dessous, avec les résultats obtenus dans les paragraphes concernant chaque groupe d'espèces testées (paragraphe 4.3.).

#### 4.1.3.2. Méthodologie

Tous les animaux sont testés au préalable par ADHS. Le sang est prélevé sur tube sec :

- à la veine jugulaire chez les ovins, bovins et poulets (après décapitation)
- dans la cavité cardiaque pour les animaux sauvages tués ou euthanasiés (à défaut la sérologie a pu être faite à partir du fluide cardio-thoracique).

Le parasite est ensuite recherché chez les animaux séropositifs par digestion pepsique du cerveau et/ou du coeur selon la méthode de Dubey (1998c) (annexe 15).

### 4.1.4. Typage génétique des toxoplasmes isolés

Le typage génétique des isolats de toxoplasme repose sur l'analyse du polymorphisme allélique de cinq marqueurs microsatellites : *TUB2*, *W35*, *TgM-A*, *B18* et *B17* (annexe 19) (Ajzenberg et al., 2002a ; 2004 ; 2005). Leur association permet un typage très résolutif qui peut mettre en évidence des recombinaisons alléliques, non détectés par la méthode classique de typage unilocus par *SAG2* PCR-RFLP. Le typage est réalisé après amplification des séquences par PCR multiplexe (Ajzenberg et al., 2005) :

- l'ADN est extrait du cerveau ou du liquide d'ascite des souris infectées par les isolats d'origine animale avec le kit QIAamp<sup>®</sup> DNA mini kit (Qiagen, Courtabœuf, France).
- les amorces sont synthétisées par Applied Biosystems (Courtabœuf, France). Pour chaque paire d'amorce, une amorce est couplée à la 6-carboxyfluorescéine (6FAM) ou à l'hexachloro-6-carboxyfluorescéine (HEX) à l'extrémité 5' (annexe 19) afin de déterminer la longueur des produits de PCR sur séquenceur automatique
- la PCR est réalisée avec le QIAGEN<sup>®</sup> Multiplex PCR kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) : 0,04 µM de chaque amorce (Roche Diagnostics, Meylan, France), 4 µl

d'ADN et 6 µl d'eau sont ajoutés dans le Multiplexe Master Mix fourni par QIAGEN (concentration finale 1x) dans un volume total de 25 µl.

- l'amplification est réalisée par un thermocycler GeneAmp® PCRSystem 2700 (Applied Biosystems, Courtaboeuf) :
  - dénaturation initiale à 95°C pendant 15 min
  - 35 cycles d'amplification : 94°C (30 s), 63°C (3 min) et 72°C (60 s) / cycle
  - extension finale à 60°C pendant 30 min
- les produits de PCR sont visualisés, avec un marqueur de poids moléculaire V (Roche Diagnostics, Meylan, France), après électrophorèse sur un gel d'agarose (2% m/v) contenant du bromure d'éthidium (figure 23).
- suivant l'intensité des bandes observées, les produits de PCR sont dilués jusqu'au 1/15 dans du formamide désionisé, avant électrophorèse sur séquenceur automatique. Un microlitre de chaque produit dilué est mélangé avec 0,5 µl du marqueur de taille fluorescent GeneScan™ ROX 500 (75-500 pb, Applied Biosystems, Courtaboeuf) et 23 µl de formamide désionisé
- ce mélange est dénaturé et analysé par électrophorèse sur un gel POP4 de polyacrylamide retenu dans un capillaire (47cm / 50 µm) (Applied Biosystems, Courtaboeuf). L'émission de fluorescence est enregistrée par un séquenceur automatique (Abiprism 310 collection 1.0, Applied Biosystems, Courtabœuf) et analysée par le logiciel GeneScan™ Analysis version 2.1 (Applied Biosystems, Courtabœuf).

La figure 24 montre le profil de migration obtenu pour un isolat de type II après électrophorèse des produits de PCR sur séquenceur automatique. A chaque pic significatif de fluorescence correspond un allèle et sa longueur en pb. Un génotype est caractérisé par une combinaison particulière d'allèles (annexe 20). Un allèle est souvent commun à plusieurs types, ce qui démontre la nécessité d'une analyse multilocus pour étudier la diversité génétique du toxoplasme.

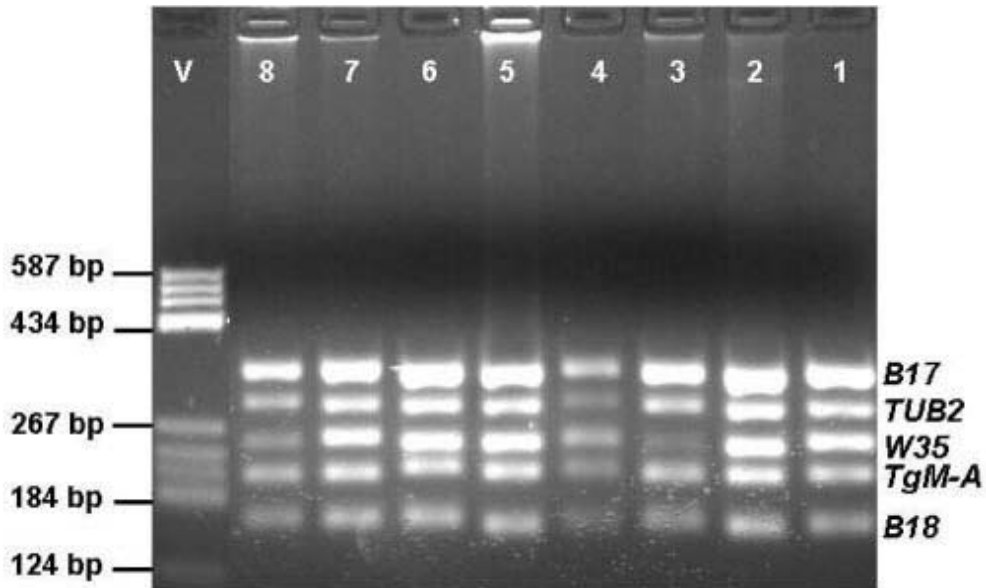


Figure 23 : Exemple d'électrophorèse sur gel d'agarose après amplification de cinq marqueurs microsatellites par PCR multiplexe (Ajzenberg et al., 2005). Pistes, isolats : 1, BK ; 2, ME49 ; 3, NED ; 4, BOU, 5, DEG ; 6, RMS-2001-MAU ; 7, PSP-2003-KOM ; 8, GUY-2002-MAT ; V, marqueur de poids moléculaire.

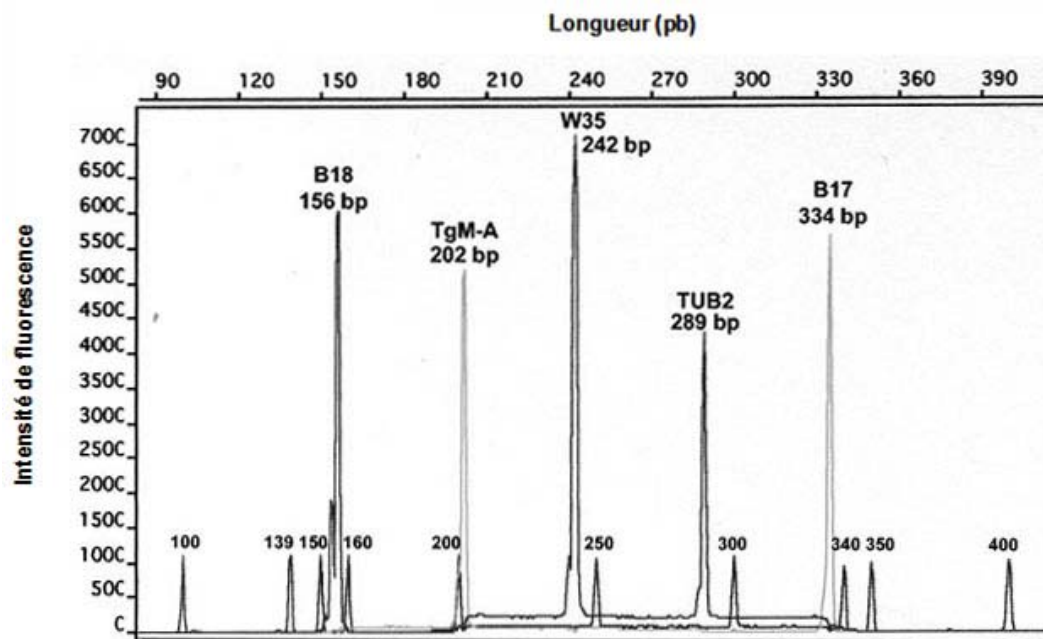


Figure 24 : Exemple d'électrophorèse des produits de PCR multiplexe d'un génotype II (Me49) sur séquenceur automatique (Ajzenberg et al., 2005).

## 4.2. Prévalence des oocystes dans l'eau, le sol et les fèces

Les oocystes de toxoplasme ont été recherchés sur un total de :

- **50 prélèvements d'eaux**, principalement de surface (tableau 16). Ils ont été classés selon des critères géographiques et en tenant compte également d'un certain contexte épidémiologique.
- **5 prélèvements de sol**
- **11 pools de fèces** de chats errants ou domestiques

Nous avons trouvé quatre prélèvements d'eaux de surface contaminés avec des éléments parasitaires d'origine coccidienne, autres que les cryptosporidies (PVT N°5, 16, 23, 30) (tableaux 15 et 16) : oocystes ou sporocystes. Les caractéristiques morphologiques et les propriétés d'autofluorescence de ces éléments les rapprochent des genres *Toxoplasma*, *Hammondia*, *Neospora* ou *Sarcocystis* (tableau 15). Ces éléments ont été retrouvés en IMS-4B6 pour deux prélèvements (PVT 5 et 30) et par flottation et autofluorescence pour deux autres (PVT 16 et 23).

Malheureusement, l'inoculation à la souris et/ou la PCR n'ont pas confirmé la nature toxoplasmique de ces éléments parasitaires. Cette absence de conclusion sur la nature de ces éléments souligne la limite de l'IMS-4B6 en raison des réactivités avec d'autres coccidies.

D'autres protozoaires ont en revanche pu être identifiés.

Les cryptosporidies et les *Giardia* ont été recherchés dans 28/50 prélèvements (tableau 16) :

- 17 prélèvements sont contaminés par des cryptosporidies
- 13 par des *Giardia*
- 11 par des cryptosporidies et des *Giardia*

Le prélèvement 8, provenant d'un abreuvoir pour poulets, était très contaminé par des oocystes d'*Eimeria* sp. (tableau 16). Ces oocystes ont présenté une réactivité en IFI avec l'AcM 4B6.

Aucun toxoplasme n'a été détecté dans les prélèvements de sols, ni dans les fèces provenant de différents sites (notamment du site carte E, annexe 16). D'autres oocystes ou sporocystes du genre *Eimeria*, *Isospora* et *Sarcocystis* ont été isolés et réagissent avec l'AcM 4B6 en IFI.

PVT N°	Caractéristiques des stades observés Morphologie / Réactivité en IFI / Autofluorescence / Taille / Signe de viabilité <sup>a</sup>	Inoculation à la souris	PCR en temps réel
5	<ul style="list-style-type: none"> <li>1 sporocyste intact IFI+ / autofluorescence - 8 x 5 µm pas de sporozoïtes visibles : pas de signe de viabilité</li> </ul>	NF <sup>d</sup>	Négative
16 <sup>b</sup>	<ul style="list-style-type: none"> <li>1 oocyste sporulé, abîmé, contenant 2 sporocystes IFI non faite / <b>autofluorescence</b> + mesure difficile en raison de la présence de nombreux débris mais morphologie <i>Toxoplasma</i>-like contenu interne granuleux : pas de signe de viabilité</li> </ul>	Négative	Négative
23 <sup>b</sup>	<ul style="list-style-type: none"> <li>1 oocyste sporulé contenant 2 sporocystes IFI non faite / <b>autofluorescence</b> ++ 13,6 x 12,6 µm sporozoïtes visibles : pas de signe de viabilité</li> <li>1 oocyste sporulé, abîmé, contenant 2 sporocystes 10,5 x 8,4 µm (en raison de la paroi rétractée) IFI non faite / <b>autofluorescence</b> + sporocystes vides : oocyste non viable</li> </ul>	Négative	Négative
30 <sup>c</sup>	<ul style="list-style-type: none"> <li>1 sporocyste intact IFI+ / <b>autofluorescence</b> + 9,6 x 7,2 µm contenu non granuleux : pas de signe de viabilité</li> </ul>	NF	Négative

**Tableau 15 : Prélèvements d'eaux de surface contaminées avec des éléments parasitaires d'origine coccidienne.** <sup>a</sup> en l'absence d'un test de viabilité existant pour l'oocyste de toxoplasme, les signes de viabilité sont basés sur l'observation du contenu interne des sporocystes en microscopie en contraste de phase. <sup>b</sup> prélèvements analysés après flottation sur saccharose-phénol ; pas d'IMS ni d'IFI. <sup>c</sup> prélèvement en sortie de station d'épuration. <sup>d</sup> NF, non fait.

PVT N°	Type <sup>a</sup>	Volume traité (L)	Turbidité (NTU)	pH	T°C	Nb <i>Cryptosporidium</i> sp. / L	Nb <i>G. intestinalis</i> / L	<i>Toxoplasma</i> -like
<b>Cours de la Seine (CHU Rouen) (ND, données non disponibles)</b>								
10	ND	ND	ND	ND	ND	0	0,125	
29	ND	ND	ND	ND	ND	0	0	
<b>30</b>	ND	ND	ND	ND	ND	<b>0,6</b>	<b>2,2</b>	<b>X</b>
31	ND	ND	ND	ND	ND	1,6	0,4	
32	ND	ND	ND	ND	ND	1,6	1,2	
33	ND	ND	ND	ND	ND	0,2	0	
34	ND	ND	ND	ND	ND	2,6	1,8	
35	ND	ND	ND	ND	ND	0,25	0	
36	ND	ND	ND	ND	ND	0,375	0	
37	ND	ND	ND	ND	ND	1,5	4,13	
38	ND	ND	ND	ND	ND	1,88	3,38	
39	ND	ND	ND	ND	ND	4,13	3,38	
40	ND	ND	ND	ND	ND	0,75	0	
41	ND	ND	ND	ND	ND	1,5	10,13	



PVT N°	Type <sup>a</sup>	Volume traité (L)	Turbidité (NTU)	pH	T°C	Nb <i>Cryptosporidium</i> sp. / L	Nb <i>G. intestinalis</i> / L	<i>Toxoplasma</i> -like
<b>Prélèvements d'eaux de surface entrant dans la filière de potabilisation de l'eau de boisson</b>								
18	S	17	NF <sup>d</sup>	NF	NF	0,058	1,76	
19	S	20	NF	NF	NF	0,15	0	
20	S	20	NF	NF	NF	0	0	
21	S	20	NF	NF	NF	0	0	
22	S	20	NF	NF	NF	0,05	0,05	
28 <sup>b</sup>	C	400	0,06	8,1	24	NF	NF	
43 <sup>c</sup>	S	500	0,1	6,3	15	NF	NF	
<b>Zones résidentielles urbaines/semi-urbaines (exemples cartes C et D, annexe 16)</b>								
1	C	40	2,71	7,41	12	0,05	0	
2	C	30	3,60	7,48	13	0	0	
3	C	20	35,57	7,19	11	0	0	
4	C	20	7,96	7,37	12,5	0	0	
<b>5</b>	<b>C</b>	<b>20</b>	<b>6,15</b>	<b>7,34</b>	<b>12,5</b>	<b>NF</b>	<b>NF</b>	<b>X</b>
6	C	28	3,20	7,22	13	NF	NF	
7	S	30	3,83	7,40	10	0	0	

PVT N°	Type <sup>a</sup>	Volume traité (L)	Turbidité (NTU)	pH	T°C	Nb <i>Cryptosporidium</i> sp. / L	Nb <i>G. intestinalis</i> / L	<i>Toxoplasma</i> -like
9	C	20	69,7	7,31	13	NF	NF	
11	C	40	9,04	5,83	10	NF	NF	
15	C	10	13,86	7,95	NF	0	0	
42	S	20	8,53	7,61	20	NF	NF	
50	C	18	28,57	7,18	21	NF	NF	

**Point de nourrissage de chats errants en zone rurale (carte E, annexe 16)**

<b>16</b>	<b>S</b>	<b>0,20</b>	<b>NF</b>	<b>NF</b>	<b>18</b>	<b>NF</b>	<b>NF</b>	<b>X</b>
17	S	40	1,61	6,86	18	NF	NF	
<b>23</b>	<b>S</b>	<b>0,45</b>	<b>NF</b>	<b>NF</b>	<b>25</b>	<b>NF</b>	<b>NF</b>	<b>X</b>
24	S	20	78,3	6,93	25	NF	NF	
25	S	10	20,3	6,77	25	NF	NF	
26	S	10	27,4	6,56	21	NF	NF	
27	S	3	NF	6,56	21	NF	NF	

**Exploitation ovine avec antécédents récents de toxoplasmose et présence de ragondins infectés (carte B, annexe 16)**

12	C	10	10,48	7,34	NF	NF	NF	
13	C	20	4,37	6,84	NF	NF	NF	

PVT N°	Type <sup>a</sup>	Volume traité (L)	Turbidité (NTU)	pH	T°C	Nb <i>Cryptosporidium</i> sp. / L	Nb <i>G. intestinalis</i> / L	<i>Toxoplasma</i> -like
14	S	20	1,42	6,20	NF	0	0	
44	S	20	5,39	6,77	21	NF	NF	
45	C	20	7,12	6,54	21	NF	NF	
46	S	20	10,05	6,57	21	0	0,1	
47	S	12	28,37	6,89	21	NF	NF	
48	S	18	12,01	7,03	21	0,06	0,61	
49	S	30	2,42	6,49	20	NF	NF	
<b>Élevage de volaille où des toxoplasmes ont été isolés de poulets séropositifs (cf. section 4.3.3.)</b>								
8	S	2,5	40,45	6,92	18	NF	NF	

**Tableau 16 : Caractéristiques des 50 prélèvements d'eaux réalisés dans différents contextes épidémiologiques.** <sup>a</sup> C, eau courante ; S, eau stagnante. <sup>b</sup>, eau potable, au robinet. <sup>c</sup>, eau d'un puits. <sup>d</sup>NF, non fait.

### 4.3. Prévalence chez les animaux d'élevage

*Nous avons choisi d'étudier la prévalence du toxoplasme chez les ovins, les bovins et le poulet pour plusieurs raisons :*

- *outre le fait que ces animaux s'infectent via les oocystes, ils constituent un réservoir important d'infection pour l'homme. En effet, les viandes de bœuf, de poulet et d'agneau sont respectivement les première, troisième et quatrième viandes les plus consommées en France<sup>3</sup>. Les viandes de bœuf et d'agneau sont souvent consommées peu cuites.*
- *les productions bovine et ovine sont les deux premières productions animales en Limousin. Les conduites extensives d'élevage favorisent un contact avec les oocystes présents dans le sol et dans l'eau. De la même façon, les poulets élevés traditionnellement, en plein air, semblent plus exposés au toxoplasme que des poulets d'élevages industriels.*
- *la séroprévalence actuelle de la toxoplasmose chez les animaux de boucherie est à préciser. La prévalence parasitaire et le génotype des toxoplasmes isolés de la viande ovine, bovine ou de poulet sont peu ou pas connus.*

*Les travaux présentés dans cette partie sont considérés comme préliminaires à des études futures, plus extensives, qui devront apprécier le risque de contamination humaine liée à la consommation de viande en général.*

#### 4.3.1. Ovins

Nous avons voulu montrer deux aspects de la toxoplasmose ovine, en présentant le résultat de deux études de séroprévalence (i) dans un élevage présentant des antécédents d'avortements toxoplasmiques et (ii) parmi les animaux abattus en Limousin et destinés à la consommation.

#### 4.3.1.1. Séroprévalence dans une ferme avec antécédents d'avortements toxoplasmiques

##### ○ Contexte

Cette exploitation de 80 ha est située dans une commune du nord de la Dordogne (24). Sa production animale est entièrement ovine. Le troupeau est constitué de 510 animaux répartis en : brebis (350), agneaux (150) et béliers (10). La ferme est isolée mais certaines prairies éloignées d'1 km sont limitrophes d'un village d'une centaine d'habitants. L'éleveur a un chat mâle âgé de 6 ans.

Le troupeau a connu deux épisodes d'avortements toxoplasmiques, concernant 6 brebis en novembre 2003 puis 5 agnelles en février 2004, toutes en fin de gestation (120-150j). Un test ADHS commercial (ToxoScreen<sup>®</sup>, bioMérieux) a mis en évidence des sérologies très positives (1/8000) chez les agnelles qui ont avorté (analyses réalisées par le laboratoire vétérinaire départemental de la Haute-Vienne). Des antécédents d'avortements avaient été signalés en 2002 et associaient sur la période, *Chlamydia psittaci* (agent de la chlamydie), *Coxiella burnetii* (agent de la fièvre Q) et *Toxoplasma gondii* comme agents étiologiques. Le vaccin Ovilis Toxovax<sup>4</sup>, vaccin antitoxoplasmique destiné aux seuls ovins, n'est pas utilisé par l'éleveur.

##### ○ Méthodologie

La campagne de prélèvements s'est déroulée en mai 2004. Le sérum des animaux est testé au 1/20, 1/40 et 1/400. Le lot A est constitué d'agnelles et de leur(s) agneau(x), et de brebis issus du troupeau dans lequel les avortements ont eu lieu au mois de février 2004. Des agneaux, nés à la même période (février-mars 2004) dans un autre lot, sont également testés (lot B).

Un questionnaire est proposé à l'éleveur pour connaître ses pratiques d'élevage et identifier la ou les source(s) de contamination. Son chat est testé en ADHS.

##### ○ Résultats

La séroprévalence globale de la toxoplasmose est de 61,1% (43/79 animaux) (tableau 17). 76,7% des agnelles exposées au toxoplasme quatre mois auparavant ont une sérologie

---

<sup>3</sup> D'après l'enquête INCA 1999, enquête nationale sur les consommations alimentaires des adultes et des enfants

<sup>4</sup> Ce vaccin est commercialisé par la société Intervet

très positive ( $\geq 1:400$ ). Le statut immunitaire de leur(s) agneau(x) n'a pu être évalué que dans cinq cas. Tous les agneaux sauf un sont positifs. Les brebis du même lot ont une prévalence plus faible (23,8%). Des agneaux nés en février-mars mais qui n'auraient pas été exposés au toxoplasme (lot B) ont une séroprévalence de 47,8%.

Animaux	ADHS				Total (% positifs)
	<1/20	1/20	1/40	$\geq 1/400$	
<b>Lot A</b>					
Agnelles	7			23	30 (76,7%)
Brebis	16		3	2	21 (23,8%)
Agneaux	1		1	3	5 (80,0%)
<b>Lot B</b>					
Agneaux	12		6	5	23 (47,8%)
<b>Total</b>	<b>36</b>		<b>10</b>	<b>33</b>	<b>79 (61,1%)</b>

**Tableau 17 : Séroprévalence de la toxoplasmose dans un troupeau ovin sujet à des cas récents d'avortements toxoplasmiques.**

L'effectif prélevé (n=79) représente 15% du cheptel (n=510). Il est faible mais correspond aux seuls animaux qui étaient encore en bergerie au mois de mai. Seulement cinq couples agnelles-agneau ont pu être testés à partir des 23 agnelles positives en ADHS. Les autres agneaux correspondants étaient déjà abattus à cette date. Les trois agneaux séropositifs au 1/400 du lot A ont été abattus en août 2004. Deux isolats de type II (FR-2004-*Ovi ari* 01 et FR-2004-*Ovi ari* 02) ont été obtenus à partir du cœur de deux des trois agneaux.

A l'issue du questionnaire, la source de contamination n'a pu être identifiée. Selon l'historique d'élevage, la contamination du lot d'agnelles aurait eu lieu lors du passage du troupeau sur une prairie permanente voisine du bourg de la commune. Des chats sont fréquemment observés dans cette prairie et aux abords du bourg. A l'inverse, un seul chat visite, irrégulièrement, la ferme en plus du chat du propriétaire. Son chat chasse beaucoup ce qui l'expose au parasite (ADHS positive  $\geq 1:400$ ). Il fréquente les bâtiments d'élevage et les

réserves de fourrages mais n'a pas accès aux réserves de grains. Ces réserves font d'ailleurs l'objet d'un contrôle des rongeurs et des insectes nuisibles.

Animaux	ADHS				Nb positifs/Nb total (%)
	<1/20	1/20	1/40	≥1/400	
<b>Agneaux</b>					
Bellac	59	2	2	7	14 /70 (15,7%)
Limoges	53	5	8	5	18/71 (25,4%)
<b>Total</b>	112	7	10	12	29/141 ( <b>20,6%</b> )
<b>Brebis</b>					
Bellac	13		4	16	20/33 (60,6%)
Limoges	14		3	16	19/33 (57,8%)
<b>Total</b>	27		7	32	39/66 ( <b>59,1%</b> )
<b>Total</b>	<b>139</b>	<b>7</b>	<b>17</b>	<b>44</b>	<b>68/207 (32,7%)</b>

**Tableau 18 : Séroprévalence de la toxoplasmose chez les agneaux et brebis abattus en Haute-Vienne.**

#### 4.3.1.2. Séroprévalence à l'abattoir

##### ○ Contexte

Les ovins proviennent de deux abattoirs :

- l'abattoir de Bellac (87) est situé dans un bassin majeur de la production ovine française (annexe 21). L'essentiel des animaux abattus sont des agneaux, âgés de moins de 10 mois (jusqu'à 1500/jour).
- l'abattoir de Limoges a une activité surtout bovine (« seulement » 300 ovins/jour).

##### ○ Méthodologie

Agneaux et brebis sont sélectionnés aléatoirement sur la chaîne d'abattage (1 agneau sur 10 et 1 brebis sur 5) afin d'obtenir un bon échantillonnage des élevages d'origine. Les lots

d'agneaux rassemblent généralement 20-30 animaux alors que les lots de brebis sont inférieurs à 10. Les sérums sont analysés au 1/20, 1/40 et 1/400.

○ *Résultats*

Les sérums de 207 ovins ont été analysés (141 agneaux, 66 brebis) (tableau 18). La séroprévalence est de 20,6% (29/144) chez les agneaux et de 59,1% (39/66) chez les brebis. L'essentiel des animaux abattus proviennent d'élevages haut-viennois (tableau 19).

Provenance	Agneaux		Brebis		Total
	<1:20	≥1:20	<1:20	≥1:20	
Allier			1		1
Aveyron	4				4
Charente	6	1			7
Charente-Maritime			1	1	2
Corrèze	1		1	1	3
Creuse	3				3
Dordogne	4				4
Indre	1				1
Lot	2				2
Lozère	3		1		4
Puy-de-Dôme			2	7	9
Saone-et-Loire		1			1
Deux-Sèvres	8	4		1	13
Vienne	9	1	2	3	15
Haute-Vienne	68	16	19	26	129
Pays-Bas	3	5			8
Indéterminée		1			1
<b>Total (%)</b>	<b>112 (79,4)</b>	<b>29 (20,6)</b>	<b>27 (40,9)</b>	<b>39 (59,1)</b>	<b>207</b>

**Tableau 19 : Séroprévalence de la toxoplasmose chez les agneaux et brebis abattus en Haute-Vienne selon leur origine géographique.**



### 4.3.2. Bovins

#### ○ Contexte

La séroprévalence de la toxoplasmose bovine est mal connue car certains tests sérologiques ne sont pas applicables à ces animaux (cas du dye test) (Tenter et al., 2000). L'ADHS est avec l'ELISA le test sérologique le plus sensible.

#### ○ Méthodologie

Les sérums ( $n=200$ ) sont fournis par le Laboratoire Départemental d'Analyses et de Recherche de la Haute-Vienne (Limoges). Ils proviennent de campagnes annuelles de prophylaxie effectuées chez les animaux âgés de plus de 24 mois. Deux sérums sont sélectionnés par élevage et sont analysés au 1/20, 1/40 et 1/400.

#### ○ Résultats

La séroprévalence est de 27,5% (55/200) (tableau 20).

ADHS				Nb positifs/Nb total (%)
<1/20	1/20	1/40	$\geq 1/400$	
145	10	30	15	55/200 (27,5%)

**Tableau 20 : Séroprévalence de la toxoplasmose bovine en Limousin.**

### 4.3.3. Poulets

#### ○ Contexte

Le poulet est devenu un bon modèle d'étude de la diversité génétique des toxoplasmes présents dans le sol et l'environnement. Les poulets proviennent de six élevages de plein air situés en Haute-Vienne. Ces élevages sont spécialisés dans l'ornement mais certains poulets sont abattus pour une consommation familiale.

○ *Méthodologie*

Pour chaque animal tué (âge  $\leq 6$  mois), le sang, le cerveau et/ou le cœur, sont prélevés et sont déposés au laboratoire dans un délai maximum de 4-5 j. Le sérum est analysé par ADHS. Le seuil de positivité est fixé au 1/10, et les sérums sont dilués de 2 en 2, généralement jusqu'au 1/80. La prévalence du parasite dans les tissus des animaux séropositifs est objectivée par inoculation à la souris du cerveau et/ou du cœur après digestion pepsique.

○ *Résultats*

54 poulets ont été analysés (tableau 21). La séroprévalence est de 18,5% (10/54). Les animaux positifs de l'élevage 4 ont une ADHS  $\geq 1/80$  ; celui de l'élevage n°5 au 1/40. Pour tous ces poulets, seul le cerveau a été inoculé, le cœur n'ayant pas été prélevé. Au total, cinq isolats ont été obtenus. Ils proviennent du même élevage et sont de type II. Dans le même temps, des prélèvements d'eau et de sols dans l'élevage n'ont pas permis d'isoler d'oocystes (cf. paragraphe 4.2.).

Elevage n°	Nb de poulets analysés	Nb de poulets positifs (ADHS $\geq$ 1/10)	Isolement (organes)	Isolat (génotype)
1	10	0		
2	6	0		
3	10	0		
4	10	9	5/9 (cerveau)	FR-2005-Gal dom 01 (II) FR-2005-Gal dom 02 (II) FR-2005-Gal dom 03 (II) FR-2005-Gal dom 04 (II) FR-2005-Gal dom 05 (II)
5	8	1	0/1 (cerveau)	
6	10	0		
<b>Total</b>	<b>54</b>	<b>10 (18,5%)</b>	<b>5</b>	

**Tableau 21 : Caractéristiques biologiques et génétiques de la toxoplasmose chez des poulets de plein air en Haute-Vienne**

## 4.4. Prévalence chez les animaux sauvages

### 4.4.1. Ragondins

#### ○ Contexte

Le ragondin (*Myocastor coypus*) est un rongeur sud-américain introduit en France en 1882 puis en 1925 pour l'industrie de la fourrure (Jouventin et al., 1996). En l'absence de leurs prédateurs naturels, les animaux échappés des fermes d'élevage ont depuis colonisé une grande partie des zones humides françaises. La régulation de l'espèce est autorisée.

#### ○ Méthodologie

Les ragondins proviennent de quatre zones rurales ou périurbaines de Haute-Vienne. Le site n°4 est visible sur la carte B (annexe 16).

Les animaux sont capturés toute l'année avec des pièges-boîtes posés près des galeries d'accès à l'eau. Les ragondins sont analysés au maximum 3 jours après leur capture. Le sexe et l'âge ( $\leq 1$  an ou  $> 1$  an) sont notés pour chaque animal. Le seuil de positivité de l'ADHS est fixé au 1/20. Le parasite est recherché dans les tissus des animaux séropositifs après digestion pepsique.

#### ○ Résultats

La population analysée est de 34 mâles, 17 femelles, et 3 individus indéterminés. Elle est répartie en 30 ragondins  $\leq 1$  an, 23 ragondins  $> 1$  an et d'un individu d'âge indéterminé. La séroprévalence globale est de 20,4% (11/54) (tableau 22). Les animaux séropositifs sont 5 animaux  $\leq 1$  an et 4  $> 1$  an. Deux isolats (FR-2004-*Myo* coy 01 et FR-2005-*Myo* coy 01) ont été obtenus à partir de deux ragondins adultes présentant des titres élevés ( $\geq 1/320$ ). Ces isolats sont de génotype II.

Site	Nombre de ragondins analysés	Nombre de ragondins positifs (ADHS $\geq$ 1/20)	Isolement (organes)	Isolat (génotype)
1	36	5	1/5 (cerveau)	FR-2004- <i>Myo coy</i> 01 (II)
2	3	1	0/1	
3	2	0		
4	13 <sup>a</sup>	5	1/3 (cerveau)	FR-2005- <i>Myo coy</i> 01 (II)
<b>Total</b>	<b>54</b>	<b>11</b>	<b>2</b>	

**Tableau 22 : Caractéristiques biologiques et génétiques de la toxoplasmose chez des ragondins en Haute-Vienne.** <sup>a</sup> dont deux femelles gestantes (une positive au 1/160, isolement négatif).

#### 4.4.2. Autres mammifères

Ce sont surtout des rongeurs capturés occasionnellement dans les zones de piégeage des ragondins (tableau 23). Les rongeurs sont très majoritaires (14 animaux, 5 espèces). Un rat surmulot (*Rattus norvegicus*) et un rat musqué ont présenté des sérologies positives (au 1/320 et 1/20 respectivement) mais le toxoplasme n'a pas été isolé.

Espèce	Nom vernaculaire	Nb positifs/Nb total	Isolement
<i>Erinaceus europaeus</i>	Hérisson d'Europe	0/1	
<i>Oryctolagus cuniculus</i>	Lapin de garenne <sup>a</sup>	0/1	
<i>Arvicola terrestris</i>	Campagnol terrestre	0/1	
<i>Mus musculus</i>	Souris domestique	0/6	
<i>Rattus rattus</i>	Rat noir	0/1	
<b><i>Rattus norvegicus</i></b>	<b>Rat surmulot</b>	<b>1/3</b>	<b>Pas d'isolement</b>
<b><i>Ondrata zibethicus</i></b>	<b>Rat musqué</b>	<b>1/4</b>	<b>Pas d'isolement</b>
<b>Total</b>		<b>2/17</b>	

**Tableau 23 : Séroprévalence de la toxoplasmose chez 7 espèces de mammifères sauvages en Limousin.** <sup>a</sup> animal congelé.

#### 4.4.3. Oiseaux sauvages

##### ○ Contexte

Les oiseaux proviennent d'un centre de soins (Verneuil/Vienne, 87). Ce centre recueille près de 90% d'oiseaux (dont 50% de rapaces) et 8% de petits mammifères (hérissons), de la région Limousin. Cette activité représente 350 à 400 animaux/an. Le gibier et les animaux domestiques y sont en principe refusés.

Les principales causes d'admission sont les tirs sur espèces protégées, les chocs avec véhicule et les électrocutions. Les oiseaux convalescents sont nourris avec des poussins d'élevage congelés (pour les rapaces) ou avec des vers (pour les autres espèces). En période de reproduction (avril à juillet), de nombreux jeunes tombés du nid sont amenés au centre.

##### ○ Méthodologie

La recherche porte exclusivement chez les animaux euthanasiés (50% dès l'admission). Après injection d'une surdose de phénobarbital (200 mg/kg), les oiseaux sont placés à 4°C et analysés au maximum 3 jours plus tard. L'ADHS est réalisée à partir du fluide cardio-thoracique du 1/10 au 1/160. Le toxoplasme est mis en évidence dans le cœur et/ou le cerveau des animaux séropositifs par inoculation à la souris.

##### ○ Résultats

Vingt-huit oiseaux répartis en 16 espèces ont été analysés. Le tableau 24 montre que 50% (14/28) d'entre eux étaient des rapaces. La séroprévalence globale est de 17,9% (5/28). Quatre animaux positifs appartiennent à trois espèces de rapaces : deux buses (*Buteo buteo*), une effraie (*Tyto alba*) et une chouette hulotte (*Strix aluco*). Le cinquième animal est un martinet noir (*Apus apus*), espèce strictement insectivore. Les cinq oiseaux sont tous adultes (âge >1an).

Les titres en anticorps sont faibles (1/40 pour tous les oiseaux). L'examen direct du cerveau des oiseaux positifs n'a jamais mis en évidence de kystes toxoplasmiques. Un seul isolat a été obtenu à partir du cerveau d'une chouette hulotte adulte (FR-2003-*Str alu* 01). Cet isolat est de génotype II. A notre connaissance, la chouette hulotte n'était pas connue jusqu'à présent comme un hôte du toxoplasme.

Espèce	Nom vernaculaire	Nb total d'oiseaux (Nb positifs)		Nb positifs/Nb total	Isolat (génotype)
		Adulte	Jeune		
<b>Rapaces</b>					
<i>Accipiter nisus</i>	Epervier d'Europe	1		0/1	
<i>Buteo buteo</i>	<b>Buse variable</b>	4 (2)	1	<b>2/5</b>	Pas d'isolement
<i>Falco tinnunculus</i>	Faucon crécerelle		1	0/1	
<i>Tyto alba</i>	<b>Effraie des clochers</b>	3 (1)		<b>1/3</b>	Pas d'isolement
<i>Strix aluco</i>	<b>Chouette hulotte</b>	2 (1)	2	<b>1/4</b>	FR-2003-Str alu 01 (II)
<b>Autres</b>					
<i>Tachybaptus ruficollis</i> <sup>a</sup>	Grèbe castagneux	1 <sup>a</sup>		0/1	
<i>Columba palumbus</i>	Pigeon ramier	1		0/1	
<i>Columba livia</i>	Pigeon domestique	2		0/1	
<i>Streptopelia decaocto</i> <sup>a</sup>	Tourterelle turque	1 <sup>a</sup>		0/1	
<i>Apus apus</i>	Martinet noir	2 (1)		1/2	Pas d'isolement
<i>Delichon urbica</i>	Hirondelle de fenêtre	1		0/1	
<i>Phylloscopus collybita</i>	Pouillot véloce	1		0/1	
<i>Parus caeruleus</i>	Mésange bleue		4	0/4	
<i>Corvus corone</i>	Corneille noire	1		0/1	
<b>Total</b>		20	8	<b>5/28 (17,9%)</b>	

Tableau 24 : Séroprévalence de la toxoplasmose chez 16 espèces d'oiseaux en Limousin. <sup>a</sup> animal congelé.

## 4.5. Discussion – circulation du toxoplasme dans l'environnement

### 4.5.1. Dans les matrices environnementales

L'analyse de 50 prélèvements d'eaux de surface et de 16 prélèvements de sols et de fèces de chats n'a pas permis de détecter d'oocystes de toxoplasme. Des éléments parasitaires d'origine coccidienne (autres que les cryptosporidies) ont été isolés de 4 prélèvements hydriques. Parmi ces prélèvements, 2 (n°16 et 23) provenaient d'une zone visitée toute l'année par de nombreux chats errants d'âges différents. Ces chats font l'objet d'un contrôle vétérinaire après leur capture et leur stérilisation. D'une manière générale, les populations de chats errants rencontrées au cours de ce travail sont infectées par le virus de la leucose féline (FeLV) et le virus de l'immunodéficience féline (FIV). Les animaux FIV positifs sont significativement plus infectés par le toxoplasme que les animaux FIV négatifs (D'Amore et al., 1997).

Nos résultats ne permettent pas de préciser la circulation des oocystes de toxoplasme dans les matrices environnementales. Toutefois, ils confirment que la densité des oocystes est probablement très faible dans une eau de surface prise au hasard. Pour seule comparaison, une prévalence d'environ 7%, basée sur la détection d'ADN toxoplasmique dans 139 prélèvements d'eaux de surface, souterraines ou de consommation, a été enregistrée en Champagne-Ardenne (Villena et al., 2004).

Plusieurs facteurs peuvent expliquer ces résultats :

#### - *l'échantillonnage*

La campagne de prélèvement n'a pu avoir lieu qu'après la mise au point expérimentale de l'IMS, c'est-à-dire à partir de fin mars 2005 jusqu'à début juillet 2005. Cette période a été particulièrement sèche, ce qui a probablement limité la survie des oocystes dans le sol. D'autre part, le déficit en précipitations a limité les phénomènes de lessivage des sols et le ruissellement des oocystes vers les points d'eau situés en bas de pente. A l'opposé, ces conditions ont eu l'avantage de concentrer les éventuels oocystes présents dans les sites visités (cf. figure 26, annexe 16, p.216, montrant une mare presque asséchée).

Quatorze prélèvements proviennent d'eaux courantes où la probabilité d'isoler des oocystes semble plus faible que dans des eaux stagnantes. Sur chaque site, d'autres caractéristiques physiques du milieu ont pu influencer sur la détection d'oocystes : site soumis au ruissellement, dimensions et profondeur du point d'eau prélevé. D'autre part, la végétation bordant les points de prélèvements pourrait agir comme un filtre naturel retenant les oocystes. La mise en place de bandes de végétation dense autour des points d'eaux est d'ailleurs préconisée par l'Agence Américaine de Protection de l'Environnement (USEPA) pour protéger certains sites sensibles à une contamination bactérienne et parasitaire de la part des animaux d'élevage (Atwill et al., 2002).

#### - *la nature des eaux*

Les eaux de surface analysées présentent des constantes physico-chimiques (seuls le pH et la température ont été mesurées) théoriquement compatibles avec la survie des oocystes (tableau 16). La plupart des prélèvements étaient assez turbides (>10-20 NTU) réduisant d'une part la capacité de filtration des cartouches et augmentant, d'autre part, la quantité de culot à traiter par IMS.

La sensibilité de toutes les méthodes de détection des protozoaires dans les eaux de surface diminue significativement quand la quantité de débris dans chaque échantillon devient trop importante (Villena et al., 2004 ; Zarlenga et Trout, 2004). Dans le cas de l'IMS, le pourcentage de récupération de *C. parvum* peut chuter de 60-70% à 0% (Bukhari et al., 1998). Il varie cependant en fonction des kits employés (Bukhari et al., 1998 ; McCuin et al., 1998) et de la nature des débris environnementaux. La différence de teneur en matière organique dans nos prélèvements a pu modifier sur la sensibilité de l'IMS. Les étapes d'aimantation ont dû être prolongées pour certains prélèvements afin de bien séparer les billes des débris. L'utilisation d'ultrasons avant la réaction d'IMS a aussi permis de diminuer les interactions entre débris. D'autre part les eaux de la région Limousin étant parmi les plus ferrugineuses de France, les ions  $Fe^{3+}$  dissous ont pu interférer avec l'aimantation des billes magnétiques.

#### - *les techniques de détection du parasite*

Notre technique d'IMS-4B6, développée expérimentalement et testée en conditions naturelles, ne détecte que les sporocystes. La technique nécessite donc une étape de sonication des oocystes pour libérer les sporocystes. Le rendement de cette étape est difficile à contrôler



car il varie probablement suivant la quantité et la nature des débris dans un prélèvement donné. L'IMS a été remplacée par la flottation sur saccharose-phénol pour les échantillons de turbidités élevées qui produisent des culots >1 ml (pour 7/50 prélèvements).

Etant donné le faible nombre d'éléments observés en IFI dans chaque prélèvement, les résultats négatifs en PCR et par l'inoculation à la souris ne sont pas étonnants. Le bio-essai chez la souris est toujours moins sensible que la PCR pour les échantillons environnementaux (Villena et al., 2004). Nos PCR ont confirmé l'absence d'inhibiteurs dans les échantillons n°5, 16, 23 et 30. L'aspect dégénéré, voire vide, de certains oocystes pourrait faire penser à une dégradation naturelle de l'ADN dans chaque site de prélèvement, expliquant la négativité de la PCR.

- *les éléments parasitaires détectés sont d'autres coccidies*

Des oocystes ou des sporocystes ont été détectés dans 4 prélèvements. Si ces éléments ne sont pas d'origine toxoplasmique, nos résultats montrent toutefois qu'il est possible de détecter par IMS des sporocystes de coccidies autofluorescentes probablement du genre *Hammondia*, *Neospora*, *Sarcocystis*, *Eimeria*. Dans ce contexte, l'IFI ne permet pas toujours d'identifier l'espèce, étant donné le manque de spécificité de l'anticorps 4B6. C'est pourquoi, nous avons inclus la PCR pour chaque prélèvement positif en IFI. Celle-ci est effectuée sur le reste de l'échantillon et s'est révélée négative, ce qui, étant donné le faible nombre d'éléments parasitaires, n'exclut pas l'existence de toxoplasme dans la première moitié de l'échantillon.

#### 4.5.2. Dans les réservoirs animaux domestiques

##### 4.5.2.1. Réservoir ovin

Historiquement, les ovins sont considérés comme les animaux de boucherie les plus contaminés par le toxoplasme (Tenter et al., 2000). L'utilisation de techniques sérologiques différentes rend la comparaison des données difficiles (cf. tableau 2 p.42). Classiquement, la séroprévalence augmente avec l'âge des animaux. Cela est confirmé pour les agneaux et les brebis abattus en Haute-Vienne : 20,6% des agneaux sont infectés contre 59,1% des brebis. Nos résultats sont similaires à ceux de Laurensou (1987) qui détectait à l'abattoir, en 1987, une séroprévalence de 50,7% (109/215 ovins, surtout des agneaux de moins de 7 mois), en utilisant un test Toxolates (Fumouze). Ils diffèrent de ceux de Pestre et al. (1962) qui avaient

détecté 36% d'animaux infectés (principalement des brebis) par dye test, mais ces animaux étaient issus d'un même élevage.

Notre méthode d'échantillonnage, sur les chaînes d'abattage, permet de limiter le biais introduit par la provenance des animaux. Par cette méthode, 2 à 3 agneaux puis 1 à 2 brebis d'un même élevage sont testés.

***Nos résultats montrent globalement que les agneaux, qui représentent l'essentiel de la consommation de viande de mouton, sont moins infectés que les brebis.***

Certains élevages peuvent être très contaminés en raison de la rémanence tellurique des oocystes dans certaines parcelles humides. Ils sont à l'origine d'avortements toxoplasmiques récurrents d'ampleur variable : de quelques animaux à plusieurs dizaines (Pestre-Alexandre et al., 1978), sans tenir compte des agneaux contaminés, nés asymptomatiques. Nos investigations menées dans un élevage ayant présenté des cas récents d'avortements toxoplasmiques n'ont pas permis de préciser les sources de contamination. La raison principale est le délai entre la survenue des avortements, leur diagnostic et les prélèvements que nous avons effectués 3-4 mois après. Il est possible d'améliorer ce délai en sensibilisant les éleveurs et les vétérinaires à la toxoplasmose même si cette protozoose ne semble pas constituer un problème majeur en santé ovine et animale en général.

#### 4.5.2.2. Réservoir bovin

Plusieurs tests sérologiques, comme le dye test, ne sont pas utilisables chez ces animaux (Esteban-Redondo, 1997). L'ADHS et l'ELISA semblent les techniques les plus fiables.

La séroprévalence en Limousin est de 27,5%. En 1987, Laurensou (1987) a mis en évidence, par Toxolates (Fumouze), une séroprévalence de 35% (85/243) parmi les animaux abattus en Corrèze. La séroprévalence trouvée dans notre étude est plus élevée qu'en Champagne-Ardenne (7,6% sur 1436 sérums analysés) (Villena, 2004), avec le même test sérologique utilisé (ADHS). Dans d'autres pays européens, des séroprévalences de 5% sont enregistrées en Norvège, 14% en Suisse, 13 à 43% aux Pays-Bas, 41% en Espagne et 43% au Portugal (Tenter et al., 2000). Nous n'avons pas pu avoir accès aux descriptifs des élevages sélectionnés, mais le Limousin est une région d'élevage extensif, ce qui favorise une exposition importante des animaux au toxoplasme.

Malgré des séroprévalences parfois élevées, il semblerait qu'une réponse immunitaire assez forte limiterait la survie des parasites chez les bovins (Esteban-Redondo, 1997). Les kystes seraient alors rapidement éliminés de leur organisme.

#### 4.5.2.3. Réservoir aviaire

Notre étude de séroprévalence chez le poulet est la première menée en France. Elle s'inscrit dans la préoccupation actuelle qui considère le poulet de plein air comme bio-indicateur de la présence d'oocystes dans le sol (tableau 25). De plus, le poulet est un animal de petite taille et un organe entier (cerveau ou cœur) peut être entièrement traité pour isoler le parasite.

Il est difficile de comparer la séroprévalence obtenue dans notre étude (18,5%) avec celles d'autres pays (tableau 25) car 90% des poulets positifs, dans notre étude, proviennent d'un seul élevage (tableau 21). Les autres études présentent le même biais car le nombre d'élevages analysés est généralement assez faible (10 à 20) et plusieurs poulets sont testés par élevage.

Les études futures doivent intégrer des plans d'échantillonnages pertinents pour évaluer le risque de toxoplasmose lié à la consommation de viande de poulet élevé en plein air.

Pays	Nombre	Séroprévalence	Génotype <sup>a</sup>	Référence
Autriche	830	36,3%	II	Dubey, Edelhofer et al., 2005
Argentine	29	65%	I, II, III	Dubey, Venturini et al., 2003
Brésil	82	39%	I, III	Dubey, Graham et al., 2002
	96	NF <sup>b</sup>	I, III	Dubey, Graham et al., 2003a
	40	40%	I, III	Dubey, Navarro et al. 2003
	198	65%	NF	Da Silva et al., 2003
Burkina-Faso	40	NF	III	Dubey, Karhemere et al., 2005
Colombie	72	44,4%	I, III	Dubey, Gomez et al., 2005
RD Congo	50	50%	I, II, III	Dubey, Karhemere et al., 2005
Égypte	121	40%	II, III	Dubey, Graham et al., 2003b
France	<b>54</b>	<b>18,5%</b>	<b>II<sup>†</sup></b>	<b>Etude présente</b>
Grenade	102	52%	I, II, III, I+III	Dubey, Bhaiyat et al., 2005
Kenya	30	13%	II	Dubey, Karhemere et al., 2005
Inde	185	39%	NF	Devada et al., 1998
	741	17,9%	II, III <sup>‡</sup>	Sreekumar et al., 2003
Israël	96	47%	II, III	Dubey, Salant et al., 2004
Mali	48	NF	II, III	Dubey, Karhemere et al., 2005
Mexique	208	6%	I, III	Dubey, Morales et al., 2004
Pérou	50	26%	I, III	Dubey, Lévy et al., 2004
Portugal	225	27%	II, III <sup>§</sup>	Dubey, Vianna et al., 2005
USA	129	17%	II, III	Dubey, Graham et al., 2003c

**Tableau 25 : Diversité génétique du toxoplasme chez le poulet de plein air.** <sup>a</sup> typage unilocus par PCR-RFLP-*SAG2* sauf <sup>†</sup> typage multilocus par microsatellites selon Ajzenberg et al. (2005), <sup>‡</sup> par PCR-RFLP-*SAG2* et 5 microsatellites selon Blackston et al. (2001), <sup>§</sup> par PCR-RFLP-*SAG2* et 5 microsatellites selon Ajzenberg et al. (2005).

### 4.5.3. Dans les réservoirs animaux sauvages

Deux réservoirs animaux sauvages du toxoplasme ont été étudiés au cours de ce travail : les rongeurs et les oiseaux.

#### 4.5.3.1. Rongeurs

Le ragondin est un rongeur qui utilise le milieu aquatique surtout pour se déplacer et coloniser de nouveaux territoires (Jouventin et al., 1996). Il se nourrit à terre, en « broutant » ras les berges des étangs et des rivières. Son mode de vie l'expose plus particulièrement à une contamination par des oocystes.

Nous avons trouvé une séroprévalence de 20,4% parmi 54 individus. Une autre étude française donne une séroprévalence de 12% en Champagne-Ardenne pour 117 ragondins analysés (Villena, 2004). Une séroprévalence plus élevée est rapportée en Italie (36% pour 41 animaux, Bollo et al., 2003). Seulement 2 isolats ont été obtenus des 11 ragondins trouvés séropositifs. D'autres isolats français proviennent de Champagne-Ardenne.

***Etant donné son statut d'espèce nuisible, le ragondin peut être utilisé comme bio-indicateur de la présence d'oocystes dans l'environnement.***

L'effectif, plus faible, des autres espèces de rongeurs ne permet pas de conclure quant à la circulation du parasite chez ces espèces. Celles-ci sont des hôtes connus du parasite, et peuvent être exposées au parasite dans un environnement contaminé. En Champagne-Ardenne, la séroprévalence de la toxoplasmose chez le rat musqué atteint 11% (I. Villena, D. Aubert, communication personnelle).

#### 4.5.3.2. Réservoir aviaire

Le faible effectif (28 animaux) ne permet pas de conclure. Une proportion importante de rapaces était attendue dans cette étude car ces oiseaux sont soumis à des contraintes plus grandes que d'autres groupes d'espèces : réputation de nuisibles, tir de plomb, collision avec véhicule et électrocution. La séroprévalence plus élevée chez les rapaces s'explique par un régime alimentaire strictement carnivore, à base de petits rongeurs pour les espèces analysées dans notre étude. Les rapaces analysés ont un habitat naturel constitué de zones rurales ou périurbaines voire de zones urbaines (faucon crécerelle, épervier d'Europe, chouette hulotte).

Ils sont assez sédentaires en Limousin, mais ils sont rejoints pendant l'hiver par des individus d'Europe du Nord.

Pour les autres espèces, une infection toxoplasmique a été détectée uniquement chez un martinet noir. Ce résultat est assez surprenant car la biologie de cette espèce migratrice l'expose peu au toxoplasme. L'oiseau passe toute sa vie en vol (sauf pour se reproduire) et est exclusivement insectivore. Deux hypothèses peuvent expliquer une contamination : (i) l'ingestion en vol d'insectes transportant passivement des oocystes ou (ii) une contamination pendant la nidification qui peut avoir lieu dans des sites accessibles aux chats (greniers). Il n'existe pas d'autres données concernant cette espèce pour comparer nos résultats.

Dubey (2002b) rapporte une séroprévalence globalement plus élevée (20-65%) chez les rapaces que chez d'autres groupes d'espèces (anatidés, galliformes, passereaux). Toutefois, la comparaison des données est rendue difficile par la multiplicité des tests sérologiques employés. L'ADHS est l'un des plus sensibles et spécifiques chez les oiseaux alors que le dye-test est inapproprié pour certaines espèces (Dubey, 2002b).

Un seul isolat a été obtenu à partir des quatre rapaces séropositifs. Cette prévalence parasitaire basée sur l'inoculation à la souris est faible. Des résultats similaires ont été rapportés par Lindsay, Smith et al. (1993) sur un nombre plus substantiel ( $n=101$ ) de rapaces nord-américains naturellement infectés. Les cas de toxoplasmoses aiguës sont rares chez les rapaces naturellement infectés (Dubey, 2002b ; Szabo et al., 2004). Ces oiseaux semblent assez résistants à une contamination expérimentale et les animaux infectés restent asymptomatiques (Lindsay, Dubey et al., 1991). Les kystes se localisent préférentiellement dans le cœur et les muscles pectoraux, puis dans le cerveau (Lindsay, Dubey et al., 1991). Si le cœur a toujours été inclus dans nos prélèvements, aucun muscle squelettique n'a été retenu en raison du mauvais état de certains oiseaux (fracture ouverte). L'utilisation du cerveau seul a probablement diminué les chances d'isoler le parasite.

Outre, le faible effectif d'animaux sauvages analysés, l'autre limite de notre étude est la qualité des prélèvements sanguins. Il n'y a pas d'analyses sanguines sur les oiseaux admis dans ce centre de soins et l'utilisation d'exsudat cardiaque est généralement d'un dernier recours. Les exsudats cardiaque, pulmonaire ou hépatique prélevés post-mortem sont cependant utilisables pour l'ADHS (Dubey, Storandt et al., 1999 ; Dubey, Parnell et al., 2004) et ont permis la détection de vrais positifs.

#### 4.5.4. Diversité génotypique

Les dix isolats de toxoplasme (5 de poulets, 2 d'ovins, 2 de ragondins et 1 d'une chouette) sont de génotype II.

En France, ce génotype est prédominant (>85% des collections) dans les toxoplasmoses humaines symptomatiques (Ajzenberg et al., 2002b, communication personnelle du Centre de Ressources Biologiques ToxoBS) et dans tous les isolats collectés chez plusieurs espèces sauvages : ragondin, rat musqué, gibier (Villena, 2004, Aubert D. et Villena I. communication personnelle). En Europe et aux Etats-Unis, le type II prédomine chez les animaux domestiques et sauvages : félins (Jungersen et al., 2002 ; Dubey, Graham et al., 2004 ; Dubey, Navarro et al., 2004 ; Dubey, Parnell et al., 2004, Montoya et al., 2004), animaux de boucherie (ovins, porcins et poulets) (Howe et Sibley, 1995 ; Mondragon et al., 1998 ; Owen et Trees 1999 ; Jungersen et al., 2002 ; Lehmann et al., 2003 ; Dubey, Graham et al., 2003c ; Dubey, Edelhofer et al., 2005b) et gibier (Dubey, Graham et al., 2004 ; Villena I, communication personnelle). Une seule étude rapporte le typage génétique d'isolats aviaires d'origine sauvage : un type III (par typage *SAG2*) a été isolé d'une bernache du Canada (*Branta canadensis*) (Dubey, Parnell et al., 2004).

Dans les pays d'Amérique du Sud, l'influence du type II semble diminuer au moins chez le poulet (tableau 25) mais il faut être prudent dans l'analyse de ces résultats qui sont issus d'un typage unilocus (PCR-RFLP *SAG2*).

Il est nécessaire de compléter ces données pour apprécier la circulation des différents génotypes dans l'environnement. D'une façon générale, les espèces migratrices pourraient favoriser une pénétration de génotypes nouveaux dans un environnement donné.

# **CONCLUSION ET PERSPECTIVES**



Jusqu'à récemment, les réservoirs hydriques n'étaient pas pris en compte dans l'épidémiologie des maladies parasitaires dues à *C. parvum*, *G. intestinalis* et *T. gondii*. La survenue d'épidémies, d'ampleur parfois exceptionnelle (McKenzie et al., 1994), a incité au développement de méthodes pour rechercher ces protozoaires dans l'eau. *C. parvum* et *G. intestinalis* bénéficient maintenant d'une recherche normalisée dans plusieurs pays industrialisés. En France, ces protozoaires sont recherchés depuis quelques années de façon quasi-systématique à la demande des autorités sanitaires nationales.

Le toxoplasme ne bénéficie pas encore de norme de recherche comparable à celles pour *C. parvum* et *G. intestinalis*. Par rapport à ces deux organismes, l'importance épidémiologique des oocystes de toxoplasme est particulière car le réservoir d'émission des oocystes est restreint aux seuls félins. La probabilité de détecter des oocystes dans un échantillon d'eau prélevé au hasard est certainement plus faible que celle de détecter des cryptosporidies ou des *Giardia*. Il est donc nécessaire de disposer de méthodes de détection assez sensibles pour mettre en évidence de très faibles densités d'oocystes, qui sont pourtant à l'origine d'une contamination importante de certains animaux d'élevages (ovins).

Notre travail s'inscrit parfaitement dans ce contexte. Sur le modèle des techniques utilisées pour *C. parvum* et *G. intestinalis*, comme la séparation immunomagnétique (IMS), nous avons développé une méthodologie de recherche des oocystes de toxoplasme dans l'eau. Elle est basée essentiellement sur la mise au point de techniques IMS qui intègrent deux nouveaux anticorps monoclonaux dirigés contre la paroi de l'oocyste.

**Sur le plan technique et méthodologique**, si aucun toxoplasme n'a été détecté à l'issue de l'analyse d'une cinquantaine de prélèvements d'eaux de surface, nos résultats montrent qu'il est toutefois possible d'isoler dans l'eau des coccidies proches du toxoplasme. D'autres laboratoires testent actuellement notre IMS sur des eaux naturellement contaminées ou sur des mollusques expérimentalement infestés.

**Les perspectives envisagées pour cette IMS sont :**

- **A court terme**, d'améliorer la spécificité des deux anticorps monoclonaux (3G4, 4B6). Il est envisagé d'utiliser l'AcM 3G4 qui reconnaît les oocystes sporulés et non sporulés sans fragmentation préalable. Les fragments Fab de cette IgM seront purifiés pour améliorer sa spécificité. Sur le plan fondamental, il est nécessaire de poursuivre

la caractérisation des antigènes reconnus par nos deux anticorps monoclonaux, pour produire éventuellement des anticorps plus spécifiques

- **A moyen terme**, de promouvoir le développement industriel d'une IMS optimisée au laboratoire et également de développer des protocoles d'IMS pour rechercher des toxoplasmes sur les végétaux et chez les hôtes paraténiques comme les mollusques
- **A long terme**, d'intégrer cette technique dans un kit de recherche des parasites hydriques dans les régions où les systèmes de traitement de l'eau sont inappropriés pour éliminer le risque hydrique parasitaire.

**Sur le plan épidémiologique**, notre travail ne permet pas de préciser la prévalence directe des oocystes dans les matrices environnementales. Il est évident que la recherche du toxoplasme dans l'environnement doit maintenant :

- être transdisciplinaire afin de comprendre la dynamique d'excrétion des oocystes par les félins, et celle d'infestation des hôtes intermédiaires.
- se faire à l'échelle mondiale, afin d'étudier la biodiversité du toxoplasme et comprendre ses conséquences sur le plan clinique

Nos études préliminaires de séroprévalence montrent l'utilité d'étudier certaines espèces animales bio-indicatrices de la contamination de l'environnement par le toxoplasme. Notre travail suggère également la nécessité de mener à moyen terme plusieurs études extensives de séroprévalence chez les animaux d'élevage dont la consommation représente un « certain » risque pour l'homme. Ces études devront aider à quantifier ce risque en fonction de chaque espèce.

**PUBLICATIONS ET  
COMMUNICATIONS PERSONNELLES**

## Publications

1. **DUMÈTRE A.**, DARDÉ M.L. How to detect *Toxoplasma gondii* oocysts in environmental samples ? *FEMS Microbiol. Rev.*, **2003**, 27, 651-661
2. **DUMÈTRE A.**, DARDÉ M.L. Purification of *Toxoplasma gondii* oocysts by cesium chloride gradient. *J. Microbiol. Methods*, **2004**, 56, 427-430
3. AJZENBERG D., BAÑULS A.L., SU C., **DUMÈTRE A.**, DEMAR M., CARME B., BRC TOXOBS, DARDÉ M.L. Genetic diversity, clonality and sexuality in *Toxoplasma gondii*. *Int. J. Parasitol.*, **2004**, 34, 1185-1196
4. **DUMÈTRE A.**, DARDÉ M.L. Immunomagnetic separation of *Toxoplasma gondii* oocysts using a monoclonal antibody directed against the oocyst wall. *J. Microbiol. Methods*, **2005**, 61, 209-217
5. AJZENBERG D., **DUMÈTRE A.**, DARDÉ, M.L. Multiplex PCR for typing strains of *Toxoplasma gondii*. *J. Clin. Microbiol.*, **2005**, 43, 1940-1943

## Communications orales

1. **DUMÈTRE A.**, DARDE M.L. Eau et Parasites : quels risques pour l'Homme ? *Fête de la Science, 15 Octobre 2002 – Université de Limoges, Limoges, France.*
2. AJZENBERG D., BAÑULS A.L., **DUMÈTRE A.**, VILLENA I., DARDE M.L., BRC ToxoBS group. Biodiversity, genetic population and phylogeny of *Toxoplasma gondii*. *Cost Action 857 Lisboa, Mai 2004, Lisbonne, Portugal.*
3. **DUMÈTRE A.**, DARDÉ M.L. Development of an immunomagnetic separation procedure to detect *Toxoplasma gondii* oocysts in water. *EMOP IX, 18-23 Juillet 2004 – Valencia, Espagne.*
4. **DUMÈTRE A.**, DARDÉ M.L. Recherche des oocystes de *Toxoplasma gondii* dans les eaux de surface par séparation immunomagnétique, immunofluorescence et PCR. *Congrès de la Société Française de Parasitologie, 25-26 Mai 2005 – Besançon, France.*
5. AJZENBERG A., DEMAR M., BAÑULS A.L., PENEAU C., **DUMÈTRE A.**, PUNWASI W., CARME B., DARDÉ M.L. Outbreak of severe toxoplasmosis with strain characterization in Surinam. *8<sup>th</sup> International Congress on Toxoplasmosis, 27-31 Mai 2005 – Porticcio, France.*

## Communications affichées

1. **DUMÈTRE A.**, DARDÉ M.L. Purification sur gradient de chlorure de césium des oocystes de *Toxoplasma gondii*. *Congrès de la Société Française de Parasitologie, 16-18 Décembre 2003* – AFSSA, Maisons-Alfort, France.
2. ROZETTE L., **DUMÈTRE A.**, COUQUET C.Y., DARDÉ M.L. Séroprévalence de la toxoplasmose chez des ovins et des bovins en Haute-Vienne. *Journées Scientifiques de l'Association pour l'Etude de l'Epidémiologie des Maladies Animales, 19-20 Mai 2005* – Paris, France.
3. AJZENBERG D., THULLIEZ P., **DUMÈTRE A.**, ROMAND S., SALLET N., ELBEZ A., DARDÉ M.L., CRB ToxoBS. Disseminated congenital toxoplasmosis transmitted by pre-conceptionally immune woman: strain characterization and experimental re-infection. *8<sup>th</sup> International Congress on Toxoplasmosis, 27-31 Mai 2005* – Porticcio, France.

# **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

- AFNOR, 2001. Qualité de l'eau – Recherche et dénombrement d'oocystes de *Cryptosporidium* et de kystes de *Giardia* – Méthode de concentration et de dénombrement NF T90-455 Juillet 2001, Saint-Denis La Plaine. Association Française de Normalisation, France
- AJZENBERG, D., BAÑULS, A.L., SU, C., DUMÈTRE, A., DEMAR, M., CARME, B., DARDÉ M.L. Genetic diversity, clonality and sexuality in *Toxoplasma gondii*. *Int. J. Parasitol.*, 2004, 34, 1185-1196
- AJZENBERG, D., BAÑULS, A.L., TIBAYRENC, M., DARDÉ, M.L. Microsatellite analysis of *Toxoplasma gondii* shows considerable polymorphism structured into two main clonal groups. *Int. J. Parasitol.*, 2002a, 32, 27-38
- AJZENBERG, D., COGNÉ, N., PARIS, L., BESSIÈRES, M.H., THULLIEZ, P., FILISETTI, D., PELLOUX, H., MARTY, P., DARDÉ, M.L. Genotype of 86 *Toxoplasma gondii* isolates associated with human congenital toxoplasmosis, and correlation with clinical findings. *J. Infect. Dis.*, 2002b, 186, 684-689
- AJZENBERG, D., DUMÈTRE, A., DARDÉ, M.L. Multiplex PCR for typing strains of *Toxoplasma gondii*. *J. Clin. Microbiol.*, 2005, 43, 1940-1943
- Anonyme, 1997. *Cyclospora cayetanensis* protocol: concentration and preparation of oocysts from produce for the polymerase chain reaction (PCR) and microscopy. [URL [www.cfsan.fda.gov/~mow/cyclmet.html](http://www.cfsan.fda.gov/~mow/cyclmet.html)]
- ARAMINI, J.J., STEPHEN, C., DUBEY, J.P. *Toxoplasma gondii* in Vancouver Island cougars (*Felis concolor vancouverensis*): serology and oocyst shedding. *J. Parasitol.*, 1998, 84, 438-440
- ARAMINI, J.J., STEPHEN, C., DUBEY, J.P., ENGELSTOFT, C., SCHWANTJE, H., RIBBLE, C.S. Potential contamination of drinking water with *Toxoplasma gondii* oocysts. *Epidemiol. Infect.*, 1999, 122, 305-315
- ARKUSH, K.D., MILLER, M.A., LEUTENEGGER, C.M., GARDNER, I.A., PACKHAM, A.E., HECKEROTH, A.R., TENTER, A.M., BARR, B.C., CONRAD, P.A. Molecular and bioassay-based detection of *Toxoplasma gondii* oocyst uptake by mussels (*Mytilus galloprovincialis*). *Int. J. Parasitol.*, 2003, 33, 1087-1097
- ASPINALL, T.V., MARLEE, D., HYDE, J.E., SIMS, P.F. Prevalence of *Toxoplasma gondii* in commercial meat products as monitored by polymerase chain reaction - food for thought ? *Int. J. Parasitol.*, 2002, 32, 1193-1199
- ATWILL, E.R., HOU, L., KARLE, B.M., HARTE, T., TATE, K.W., DAHLGREN, R.A. Transport of *Cryptosporidium parvum* oocysts through vegetated buffer strips and estimated filtration efficiency. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2002, 68, 5517-5527
- BAHIA-OLIVEIRA, L.M., JONES, J.L., AZEVEDO-SILVA, J., ALVES, C.C., OREFICE, F., ADDISS, D.G. Highly endemic, waterborne toxoplasmosis in North Rio de Janeiro State, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.*, 2003, 9, 55-62

- BARIL, L., ANCELLE, T., GOULET, V., THULLIEZ, P., TIRARD-FLEURY, V., CARME, B. Risk factors for *Toxoplasma* infection in pregnancy : A case control study in France. *Scand. J. Infect. Dis.*, 1999, 31, 305-309
- BELLI, S.I., WALLACH, M.G., LUXFORD, C., DAVIES, M.J., SMITH, N.C. Roles of tyrosine-rich precursor glycoproteins and dityrosine- and 3,4-dihydroxyphenylalanine-mediated protein cross-linking in development of the oocyst wall in the coccidian *Eimeria maxima*. *Eukaryot. Cell.*, 2003, 2, 456-464
- BENENSON, M.W., TAKAFUJI, E.T., LEMON, S.M., GREENUP, R.L., SULZER, A.J. Oocyst-transmitted toxoplasmosis associated with ingestion of contaminated water. *N. Engl. J. Med.*, 1982, 307, 666-669
- BERLIN, O.G.W., PETER, J.B., GAGNE, C., CONTEAS, C.N., ASH, L.R. Autofluorescence and the detection of *Cyclospora* oocysts. *Emerg. Infect. Dis.*, 1998, 4, 127-128
- BETTIOL, S.S., OBENDORF, D.L., NOWARKOWSKI, M., MILSTEIN, T., GOLDSMID, J.M. Earthworms as paratenic hosts of toxoplasmosis in eastern barred bandicoots in Tasmania. *J. Wild. Dis.*, 2000, 36, 145-148
- BIANCIFIORI, F., RONDINI, C., GRELLONI, V., FRESCURA, T. Avian toxoplasmosis: experimental infection of chicken and pigeon. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, 1986, 9, 337-346
- BLACKSTON, C.R., DUBEY, J.P., DOTSON, E., SU, C., THULLIEZ, P., SIBLEY, D., LEHMANN, T. High-resolution typing of *Toxoplasma gondii* using microsatellite loci. *J. Parasitol.*, 2001, 87, 1472-1475
- BLEWETT, D.A., MILLER, J.K., BUXTON, D. Simple technique for the direct isolation of *Toxoplasma* tissue cysts from fetal ovine brain. *Vet. Rec.*, 1983, 112, 98-100
- BOLLO, E., PREGEL, P., GENNERO, S., PIZZONI, E., ROSATI, S., NEBBIA, P., BIOLATTI, B. Health status of a population of nutria (*Myocastor coypus*) living in a protected area in Italy. *Res. Vet. Sci.*, 2003, 75, 21-25
- BONNIN, A., DUBREMETZ, J.F., CAMERLYNCK, P. Characterization and immunolocalisation of an oocyst wall antigen of *Cryptosporidium parvum* (Protozoa: Apicomplexa). *Parasitology*, 1991, 103, 171-177
- BONNIN, A., DUBREMETZ, J.F., CAMERLYNCK, P. A new antigen of *Cryptosporidium parvum* micronemes possessing epitopes cross-reactive with macrogamete granules. *Parasitol. Res.*, 1993, 79, 8-14
- BOSSI, P., CAUMES, E., PARIS, L., DARDE, M.L., BRICAIRE, F. *Toxoplasma gondii*-associated Guillain-Barré syndrome in an immunocompetent patient. *J. Clin. Microbiol.*, 1998, 36, 3724-3725
- BOWIE, W.R., KING, A.S., WERKER, D.H., ISAAC-RENTON, J.L., BELL, A., ENG, S.B., MARION, S.A. Outbreak of toxoplasmosis associated with municipal drinking water. *Lancet*, 1997, 350, 173-177



- BRECHT, S., CARRUTHERS, V.B., FERGUSON, D.J.P., GIDDINGS, O.K., WANG, G., JÄKLE, U., HARPER, J.M., SIBLEY, L.D., SOLDATI, D. The *Toxoplasma* micronemal protein MIC4 is an adhesin composed of six conserved apple domains. *J. Biol. Chem.*, 2001, 276, 4119-4127
- BUKHARI, Z., McCUIN, R.M., FRICKER, C.R., CLANCY, J.L. Immunomagnetic separation of *Cryptosporidium parvum* from source water samples of various turbidities. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1998, 64, 4495-4499
- BUKHARI, Z., SMITH, H.V. Effect of three concentration techniques on viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts recovered from bovine feces. *J. Clin. Microbiol.*, 1995, 33, 2592-2595.
- CABANNES, A., LUCCHESI, F., HERNANDEZ, J.C., PELSE, H., BIESEL, N., EYMONNOT, M., APPRIOU, M., TRIBOULEY-DURET, J. Enquête seroépidémiologique sur *Toxoplasma gondii* chez les ovins, bovins et félins dans le département de la Gironde. *Bull. Soc. Fr. Parasitol.*, 1997, 15, 11-22
- CALLOT, J., KREMER, M., GBETRO, L., CRANZ, G. Etude sérologique de l'incidence de la toxoplasmose chez les animaux de boucherie de Strasbourg. *Rev. Tech. Vet. Abattoir Hyg. Alimentaire*, 1970, 8, 30
- CAMPANA-ROUGET, Y., LEVITTE, F. La toxoplasmose chez les herbivores en Côtes d'Or. *Rev. Med. Vet.*, 1975, 125, 99-104
- CAREY, C.M., LEE, H., TREVORS, J.T. Biology, persistence and detection of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* oocyst. *Water Res.*, 2004, 38, 818-862
- CARME, B., BISSUEL, F., AJZENBERG, D., BOUYNE, R., AZNAR, C., DEMAR, M., BICHAT, S., LOUVEL, D., BOURBIGOT, A.M., PENEAU, C., NERON, P., DARDÉ, M.L. Severe acquired toxoplasmosis in immunocompetent adult patients in French Guiana. *J. Clin. Microbiol.*, 2002, 40, 4037-4044
- CHABASSE, D., ROBERT, R., LAVAU, M., LAHAN, R., HOCQUET, P. Etude épidémiologique de la toxoplasmose animale et humaine en Maine et Loire. *Archives Méd. de l'Ouest*, 1978, 10, 697-705
- CHANTON-GREUTMANN, H., THOMA, R., CORBOZ, L., BOREL, N., POSPISCHIL, A. Abortion in small ruminants in Switzerland: investigations during two lambing seasons (1996-1998) with special reference to chlamydial abortions. *Schweiz Arch. Tierheilkd.*, 2002, 144, 483-492
- CHESNOT, T., SCHWARTZBROD, J. Quantitative and qualitative comparison of density-based purification methods for detection of *Cryptosporidium* oocysts in turbid environmental matrices. *J. Microbiol. Methods*, 2004, 58, 375-386
- CHRISTIE, E., PAPPAS, P.W., DUBEY, J.P. Ultrastructure of excystation of *Toxoplasma gondii* oocysts. *J. Protozool.*, 1978, 25, 438-443

- COLE, R.A., LINDSAY, D.S., HOWE, D.K., RODERICK, C.L., DUBEY, J.P., THOMAS, N.J., BAETEN, L.A. Biological and molecular characterizations of *Toxoplasma gondii* strains obtained from southern sea otters (*Enhydra lutris nereis*). *J. Parasitol.*, 2000, 86, 526-530
- COOK, A.J., GILBERT, R.E., BUFFOLANO, W., ZUFFEREY, J., PETERSEN, E., JENUM, P.A., FOULON, W., SEMPRINI, A.E., DUNN, D.T. Sources of *Toxoplasma* infection in pregnant women: a european multicentre case-control study. *Br. Med. J.*, 2000, 321, 142-147
- CORONA-VASQUEZ, B., SAMUELSON, A., RENNECKER, J.L., MARIÑAS, B.J. Inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts with ozone and free chlorine. *Water Res.*, 2002, 36, 4053-4063
- COUTINHO, S.G., LOBO, R., DUTRA, G. Isolation of *Toxoplasma* from the soil during an outbreak of toxoplasmosis in a rural area in Brazil. *J. Parasitol.*, 1982, 68, 866-868
- DA SILVA, D.S., BAHIA-OLIVEIRA, L.M., SHEN, S.K., KWOK, O.C., LEHMANN, T., DUBEY, J.P. Prevalence of *Toxoplasma gondii* in chickens from an area in southern Brazil highly endemic to humans. *J. Parasitol.*, 2003, 89, 394-396
- DALTON, C., GOATER, A.D., PETHIG, R., SMITH, H.V. Viability of *Giardia intestinalis* and viability and sporulation state of *Cyclospora cayetanensis* oocysts determined by electrorotation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2001, 67, 586-590
- D'AMORE, E., FALCONE, E., BUSANI, L., TOLLIS, M. A serological survey of feline immunodeficiency virus and *Toxoplasma gondii* in stray cats. *Vet. Res. Com.*, 1997, 21, 355-359
- DANTAS-LEITE, L., URBINA, J.A., DE SOUZA, W., WOMMARO, R.C. Selective anti-*Toxoplasma gondii* activities of azasterols. *Int. J. Antimicrobiol. Agents*, 2004, 23, 620-626
- DARDÉ, M.L. Genetic analysis of the diversity in *Toxoplasma gondii*. *Ann. Inst. Super. Sanita.*, 2004, 40, 57-63
- DARDÉ, M.L., BOUTEILLE, B., PESTRE-ALEXANDRE, M. Isoenzyme analysis of 35 *Toxoplasma gondii* isolates and the biological and epidemiological implications. *J. Parasitol.*, 1992, 78, 786-794
- DARDÉ, M.L., VILLENA, I., PINON, J.M., BEGUINOT, I. Severe toxoplasmosis caused by a *Toxoplasma gondii* strain with a new isoenzyme type acquired in French Guiana. *J. Clin. Microbiol.*, 1998, 36, 324
- DAVIES, C.M., KAUCNER, C., DEERE, D., ASHBOLT, N.J.. Recovery and enumeration of *Cryptosporidium parvum* from animal fecal matrices. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2003, 69, 2842-2847
- DAVIS, S.W., DUBEY, J.P. Mediation of immunity to *Toxoplasma gondii* oocyst shedding in cats. *J. Parasitol.*, 1995, 81, 882-886
- DE BOER, S.H., WARD, L.J., LI X., CHITTARANJAN, S. Attenuation of PCR inhibition in the presence of plant compounds by addition of BLOTTO. *Nucleic Acids Res.*, 1995, 23, 2567-2568

- DELACOUR, H., CLERY, C., MASSON, P., VIDAL, D.R. Inactivation des spores bactériennes par les hautes pressions hydrostatiques. *Ann. Pharm. Fr.*, 2002, 60, 38-43
- DEMAR, M., AJZENBERG, D., MAUBON, D., PUNWASI, W., VALERY, N., PENEAU, C., COTTRELLE, B., DJOSSOU, F., DAIGRE, J.L., AZNAR, C., TERZAN, L., DARDÉ, M.L., CARME, B. Epidémie de toxoplasmose aiguë sévère en région frontalière franco-surinamienne. *Bull. Soc. Pathol. Exot.*, 2005, 98, 63
- DESMONTS, G., REMINGTON, J.S. Direct agglutination test for diagnosis of *Toxoplasma* infection: method for increasing sensitivity and specificity. *J. Clin. Microbiol.*, 1980, 11, 562-568
- DEVADA, K., ANANDAN, R., DUBEY, J.P. Serologic prevalence of *Toxoplasma gondii* in chickens in Madras, India. *J. Parasitol.*, 1998, 84, 621-622.
- DI GIORGIO, C.L., GONZALEZ, D.A., HUITT, C.C. *Cryptosporidium* and *Giardia* recoveries in natural waters by using environmental protection agency method 1623. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2002, 68, 5952-5955
- DI GIOVANNI, G.D., HASHEMI, F.H., SHAW, N.J., ABRAMS, F.A., LECHEVALLIER, M.W., ABBASZADEGAN, M. Detection of infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts in surface and filter backwash water samples by immunomagnetic separation and integrated cell culture-PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1999, 65, 3427-3432
- DOBY, J., DEUNFF, J. Toxoplasmose des herbivores d'élevage en Bretagne. *Recueil de médecine vétérinaire de l'Ecole d'Alfort*, 1984, 160, 101-106
- DUBEY, J.P. Feline toxoplasmosis and coccidiosis : a survey of domiciled and stray cats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1973, 162, 873-877
- DUBEY, J.P. Reshedding of *Toxoplasma* oocysts by chronically infected cats. *Nature*, 1976, 262, 213-214
- DUBEY, J.P. Attempted transmission of *Toxoplasma gondii* infection from pregnant cats to their kitten. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1977, 170, 538-540.
- DUBEY, J.P. Mouse pathogenicity of *Toxoplasma gondii* isolated from a goat. *Am. J. Vet. Res.*, 1980, 41, 427-429
- DUBEY, J.P. Isolation of *Toxoplasma gondii* from a naturally infected beef cow. *J. Parasitol.*, 1992, 78, 151-153
- DUBEY, J.P. Duration of immunity to shedding of *Toxoplasma gondii* oocysts by cats. *J. Parasitol.*, 1995, 81, 410-415
- DUBEY, J.P. Pathogenicity and infectivity of *Toxoplasma gondii* oocysts for rats. *J. Parasitol.*, 1996a, 82, 951-956
- DUBEY, J.P. Infectivity and pathogenicity of *Toxoplasma gondii* oocysts for cats. *J. Parasitol.*, 1996b, 82, 957-961

- DUBEY, J.P. Re-examination of resistance of *Toxoplasma gondii* tachyzoites and bradyzoites to pepsin and trypsin digestion. *Parasitology*, 1998a, 116, 43-50
- DUBEY, J.P. *Toxoplasma gondii* oocyst survival under defined temperatures. *J. Parasitol.*, 1998b, 84, 862-865
- DUBEY, J.P. Refinement of pepsin digestion method for isolation of *Toxoplasma gondii* from infected tissues. *Vet. Parasitol.*, 1998c, 74, 75-77
- DUBEY, J.P. Oocyst shedding by cats fed isolated bradyzoites and comparison of infectivity of bradyzoites of the VEG strain *Toxoplasma gondii* to cats and mice. *J. Parasitol.*, 2001, 87, 315-219
- DUBEY, J.P. Tachyzoite-induced life cycle of *Toxoplasma gondii* in cats. *J. Parasitol.*, 2002a, 88, 713-717
- DUBEY, J.P. A review of toxoplasmosis in wild birds. *Vet. Parasitol.*, 2002b, 106, 121-153
- DUBEY, J.P. Toxoplasmosis – a waterborne zoonosis. *Vet. Parasitol.*, 2004, 126, 57-72
- DUBEY, J.P., BEATTIE, C.P. *Toxoplasmosis of animals and man*. Boca Raton, FL, CRC Press, 1988, 220 p.
- DUBEY, J.P., FRENKEL, J.K. Cyst-induced toxoplasmosis in cats. *J. Protozool.*, 1972, 19, 155-177
- DUBEY, J.P., FRENKEL, J.K. Experimental *Toxoplasma* infection in mice with strains producing oocysts. *J. Parasitol.*, 1973, 59, 505-512
- DUBEY, J.P., FRENKEL, J.K. Immunity to feline toxoplasmosis: modification by administration of corticosteroids. *Vet. Path.*, 1974, 11, 350-379
- DUBEY, J.P., SHARMA, S.P. Parasitemia and tissue infection in sheep fed *Toxoplasma gondii* oocysts. *J. Parasitol.*, 1980, 66, 111-114
- DUBEY, J.P., SREEKUMAR, C. Redescription of *Hammondia hammondi* and its differentiation from *Toxoplasma gondii*. *Int. J. Parasitol.*, 2003, 33, 1437-1453
- DUBEY, J.P., BARR, B.C., BARTA, J.R., BJERKÅS, I., BJÖRKMAN, C., BLAGBURN, B.L., BOWMAN, D.D., BUXTON, D., ELLIS, J.T., GOTTSTEIN, B., HEMPHILL, A., HILL, D.E., HOWE, D.K., JENKINS, M.C., KOBAYASHI, Y., KOUDELA, B., MARSH, A.E., MATTSSON, J.G., MCALLISTER, M.M., MODRÝ, D., OMATA, Y., SIBLEY, L.D., SPEER, C.A., TREES, A.J., UGGLA, A., UPTON, S.J., WILLIAMS, D.J.L., LINDSAY, D.S. Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidia. *Int. J. Parasitol.*, 2002, 32, 929-946
- DUBEY, J.P., BHAIYAT, M.I., DE ALLIE, C., MACPHERSON, C.N.L., SHARMA, R.N., SREEKUMAR, C., VIANNA, M.C.B., KOWK, O.C.H., MISKA, K.B., HILL, D.E., LEHMANN, T. Isolation, tissue distribution, and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* from chickens in Grenada, West Indies. *J. Parasitol.*, 2005, 91, 557-560

- DUBEY, J.P., EDELHOFER, T., MARCET, P., VIANNA, M.C.B., KWOK, O.C.H., LEHMANN, T. Genetic and biologic characteristics of *Toxoplasma gondii* infections in free-range chickens from Austria. *Vet Parasitol.*, 2005, in press
- DUBEY, J.P., GOMEZ-MARIN, J.E., BEDOYA, A., LORA, F., VIANNA, M.C.B., HILL, D., KWOK, O.C.H., SHEN, S.K., MARCET, P.L., LEHMANN, T. Genetic and biologic characteristics of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from Colombia, South America. *Vet Parasitol.*, 2005, in press
- DUBEY, J.P., GRAHAM, D.H., BLACKSTON, C.R., LEHMANN, T., GENNARI, S.M., RAGOZO, A.M., NISHI, S.M., SHEN, S.K., KWOK, O.C.H., HILL, D.E., THULLIEZ, P. Biological and genetic characterisation of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens (*Gallus domesticus*) from Sao Paulo, Brazil: unexpected findings. *Int. J. Parasitol.*, 2002, 32, 99-105
- DUBEY, J.P., GRAHAM, D.H., DA SILVA, D.S., LEHMANN, T., BAHIA-OLIVEIRA, L.M.G. *Toxoplasma gondii* isolates of free-ranging chickens from Rio de Janeiro, Brazil: mouse mortality, genotype and oocyst shedding by cats. *J. Parasitol.*, 2003a, 89, 851-853
- DUBEY, J.P., GRAHAM, D.H., DAHL, E., HILALI, M., EL-GHAYSH, A., SREEKUMAR, C., KWOK, O.C.H., SHEN S.K., LEHMANN, T. Isolation and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* from chickens and ducks from Egypt. *Vet. Parasitol.*, 2003b, 30, 89-95
- DUBEY, J.P., GRAHAM, D.H., DAHL, E., SREEKUMAR, C., LEHMANN, T., DAVIS, M.F., MORISHITA, T.Y. *Toxoplasma gondii* isolates from free-ranging chickens from the United States. *J. Parasitol.*, 2003c, 89, 1060-1062
- DUBEY, J.P., GRAHAM, D.H., DE YOUNG, R.W., DAHL, E., EBERHARD, M.L., NACE, E.K., WON, K., BISHOP, H., PUNKOSDY, G., SREEKUMAR, C., VIANNA, M.C.B., SHEN, S.K., KWOK, O.C.H., SUMNERS, J.A., DEMARAIS, S., HUMPHREYS, J.G., LEHMANN, T. Molecular and biologic characteristics of *Toxoplasma gondii* isolates from wildlife in the United States. *J. Parasitol.*, 2004, 90, 67-71
- DUBEY, J.P., HOOVER, E.A., WALLS, K.W. Effect of age and sex on the acquisition of immunity to toxoplasmosis in cats. *J. Protozool.*, 1977, 24, 184-186
- DUBEY, J.P., JENKINS, M.C., THAYER, D.W., KWOK, O.C., SHEN, S.K. Killing of *Toxoplasma gondii* oocysts by irradiation and protective immunity induced by vaccination with irradiated oocysts. *J. Parasitol.*, 1996, 82, 724-727
- DUBEY, J.P., KARHEMERE, S., DAHL, E., SREEKUMAR, C., DIABATE, A., DABIRÉ, K.R., VIANNA, M.C.B., KWOK, O.C.H., LEHMANN, T. First biologic and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens from Africa (Democratic Republic of Congo, Mali, Burkina Faso, and Kenya). *J. Parasitol.*, 2005, 91, 69-72
- DUBEY, J.P., LEVY, M.Z., SREEKUMAR, C., KWOK, O.C., SHEN, S.K., DAHL, E., THULLIEZ, P., LEHMANN, T. Tissue distribution and molecular characterization of chicken isolates of *Toxoplasma gondii* from Peru. *J. Parasitol.*, 2004, 90, 1015-1018
- DUBEY, J.P., LINDSAY, D.S., SPEER, C.A. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clin. Microbiol. Rev.*, 1998, 11, 267-299

- DUBEY, J.P., LUNNEY, J.K., SHEN, S.K., KWOK, O.C.H., ASHFORD, D.A., THULLIEZ, P. Infectivity of low numbers of *Toxoplasma gondii* oocysts to pigs. *J. Parasitol.*, 1996, 82, 438-443
- DUBEY, J.P., MILLER, N.L., FRENKEL, J.K. Characterization of the new fecal form of *Toxoplasma gondii*. *J. Parasitol.*, 1970a, 56, 447-456
- DUBEY, J.P., MILLER, N.L., FRENKEL, J.K. The *Toxoplasma gondii* oocyst from cat feces. *J. Exp. Med.*, 1970b, 132, 636-662
- DUBEY, J.P., MORALES, E.S., LEHMANN, T. Isolation and genotyping of *Toxoplasma gondii* from free-ranging chickens from Mexico. *J. Parasitol.*, 2004, 90, 411-413
- DUBEY, J.P., NAVARRO, I.T., GRAHAM, D.H., DAHL, E., FREIRE, R.L., PRUDENCIO, L.B., SREEKUMAR, C., VIANNA, M.C., LEHMANN, T. Characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from free range chickens from Parana, Brazil. *Vet. Parasitol.*, 2003, 117, 229-234
- DUBEY, J.P., NAVARRO, T., SREEKUMAR, C., DAHL, E., FREIRE, R.L., KAWABATA, H.H., VIANNA, M.C.B., KWOK, O.C.H., SHEN, S.K., THULLIEZ, P., LEHMANN, T. *Toxoplasma gondii* infections in cats from Paraná, Brazil: seroprevalence, tissue distribution, and biologic and genetic characterization of isolates. *J. Parasitol.*, 2004, 90, 721-726
- DUBEY, J.P., PARNELL, P.G., SREEKUMAR, C., VIANNA, M.C.B., DE YOUNG, R.W., DAHL, E., LEHMANN, T. Biologic and molecular characteristics of *Toxoplasma gondii* isolates from striped skunk (*Mephitis mephitis*), Canada goose (*Branta canadensis*), black-winged lory (*Eos cyanogenia*) and cats (*Felis catus*). *J. Parasitol.*, 2004, 90, 1171-1174
- DUBEY, J.P., ROLLOR, E.A., SMITH, K., KWOK, O.C.H., THULLIEZ, P. Low seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in feral pigs from a remote island lacking cats. *J. Parasitol.*, 1997, 83, 870-882
- DUBEY, J.P., RUFF, M.D., CAMARGO, M.E., SHEN, S.K., WILKINS, G.L., KWOK, O.C., THULLIEZ, P. Serologic and parasitologic responses of domestic chickens after oral inoculation with *Toxoplasma gondii* oocysts. *Am. J. Vet. Res.*, 1993, 54, 1668-1672
- DUBEY, J.P., SALANT, H., SREEKUMAR, C., DAHL, E., VIANNA, M.C.B., SHEN, S.K., KWOK, O.C.H., SPIRA, D., HAMBURGER, J., LEHMANN, T.V. High prevalence of *Toxoplasma gondii* in a commercial flock of chickens in Israel, and public health implications of free-range farming. *Vet. Parasitol.*, 2004, 121, 317-322
- DUBEY, J.P., SAVILLE, J.A., STANEK, J.F., REED, S.M. Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in domestic cats from rural Ohio. *J. Parasitol.*, 2002, 88, 802-803
- DUBEY, J.P., SPEER, C.A., SHEN, S.K., KWOK, O.C.H., BLIXT, J.A. Oocyst-induced murine toxoplasmosis: life cycle, pathogenicity, and stage conversion in mice fed *Toxoplasma gondii* oocysts. *J. Parasitol.*, 1997, 83, 870-882
- DUBEY, J.P., STORANDT, S.T., KWOK, O.C., THULLIEZ, P., KAZACOS, K.R. *Toxoplasma gondii* antibodies in naturally exposed wild coyotes, red foxes, and gray foxes

and serologic diagnosis of toxoplasmosis in red foxes fed *T. gondii* oocysts and tissue cysts. *J. Parasitol.*, 1999, 85, 240-243

DUBEY, J.P., SWAN, G.V., FRENKEL, J.K. A simplified method for isolation of *Toxoplasma gondii* oocysts from the cat feces. *J. Parasitol.*, 1972, 1005-1006

DUBEY, J.P., THAYER, D.W., SPEER, C.A., SHEN, S.K. Effect of gamma irradiation on unsporulated and sporulated *Toxoplasma gondii* oocysts. *Int. J. Parasitol.*, 1998, 28, 369-375

DUBEY, J.P., THULLIEZ, P., POWELL, E.C. *Toxoplasma gondii* in Iowa sows : comparison of antibody titers to isolation of *T. gondii* by bioassays in mice and cats. *J. Parasitol.*, 1995, 81, 48-53

DUBEY, J.P., VENTURINI, M.C., VENTURINI, L., PISCOPO, M., GRAHAM, D.H., DAHL, E., SREEKUMAR, C., VIANNA, M.C., LEHMANN, T. Isolation and genotyping of *Toxoplasma gondii* from free-ranging chickens from Argentina. *J. Parasitol.*, 2003, 89, 1063-1064

DUBEY, J.P., VIANNA, M.C.B., SOUSA, S., CANADA, N., MEIRELES, S., CORREIA DA COSTA, J.M., MARCET, P.L., LEHMANN, T., DARDÉ, M.L., THULLIEZ, P. Characterization of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from Portugal. Accepted pour publication dans *The Journal of Parasitology*, 2005

DUBEY, J.P., WEIGEL, R.M., SIEGEL, A.M., THULLIEZ, P., KITRON, U.D., MITCHELL, M.A., MANNELLI, A., MATEUS-PINILLA, N.E., SHEN, S.K., KWOK, O.C.H., TODD, K.S. Sources and reservoirs of *Toxoplasma gondii* infection on 47 swine farms in Illinois. *J. Parasitol.*, 1995, 81, 723-729

DUBEY, J.P., ZARNKE, R., THOMAS, N.J., WONG, S.K., VAN BONN, W., BRIGGS, M., DAVIS, J.W., EWING, R., MENSE, M., KWOK, O.C.H., ROMAND, S., THULLIEZ, P. *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, *Sarcocystis neurona*, and *Sarcocystis canis*-like infections in marine mammals. *Vet. Parasitol.*, 2003a, 116, 275-296

DUMÈTRE, A., DARDÉ, M.L. How to detect *Toxoplasma gondii* oocysts in environmental samples ? *FEMS Microbiol. Rev.*, 2003, 27, 651-661

DUMÈTRE, A., DARDÉ, M.L. Purification of *Toxoplasma gondii* oocysts by cesium chloride gradient. *J. Microbiol. Methods*, 2004, 56, 427-430

DUMÈTRE, A., DARDÉ, M.L. Immunomagnetic separation of *Toxoplasma gondii* oocysts by using a monoclonal antibody directed against the oocyst wall. *J. Microbiol. Methods*, 2005, 61, 209-217

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

ENTRALA, E., SBIHI, Y., SANCHEZ-MORENO, M., MASCARO, C. Antigen incorporation on *Cryptosporidium parvum* oocyst walls. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 2001, 96, 233-235

- ESTEBAN-REDONDO, I., INNES, E.A. *Toxoplasma gondii* infection in sheep and cattle. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, 1997, 20, 191-196
- ESTEBAN-REDONDO, I., INNES, E.A. Detection of *Toxoplasma gondii* in tissues of sheep orally challenged with different doses of oocysts. *Int. J. Parasitol.*, 1998, 28, 1459-1466
- ESTEBAN-REDONDO, I., MALEY, S.W., THOMSON, K., NICOLL, S., WRIGHT, S., BUXTON, D., INNES, E.A. Detection of *T. gondii* in tissues of sheep and cattle following oral infection. *Vet. Parasitol.*, 1999, 86, 155-171
- EVERSON, W.V., WARE, M.W., DUBEY, J.P., LINDQUIST, H.D. Isolation of purified oocyst walls and sporocysts from *Toxoplasma gondii*. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 2002, 49, 344-349
- EYLES, D.E., GIBSON, C.L., COLEMAN, N., SMITH, C.S., JUMPER, J.R., JONES, F.E. The prevalence of toxoplasmosis in wild and domesticated animals of the Memphis region. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1959, 8, 505-510
- FARKAS, J. Irradiation as a method for decontaminating food: a review. *Int. J. Food Microbiol.*, 1998, 44, 189-204
- FAYER, R., DUBEY, J.P., LINDSAY, D.S. Zoonotic protozoa: from land to sea. *Trends Parasitol.*, 2004, 20, 531-536
- FAYER, R., GRACZYK, T.K., LEWIS, E.J., TROUT, J.M., FARLEY, C.A. Survival of infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts in seawater and eastern oysters (*Crassostrea virginica*) in the Chesapeake Bay. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1998, 64, 1070-1074
- FERGUSON, D.J.P. *Toxoplasma gondii* and sex: essential or optional extra? *Trends Parasitol.*, 2002, 18, 355-359
- FERGUSON, D.J.P. Use of molecular and ultrastructural markers to evaluate stage conversion of *Toxoplasma gondii* in both the intermediate and definitive host. *Int. J. Parasitol.*, 2004, 34, 347-360
- FERGUSON, D.J.P., BELLI, S.I., SMITH, N.C., WALLACH, M.G. The development of the macrogamete and oocyst wall in *Eimeria maxima*: immuno-light and electron microscopy. *Int. J. Parasitol.*, 33, 1329-1340.
- FERGUSON, D.J.P., BRECHT, S., SOLDATI, D. The microneme protein MIC4, or an MIC4-like protein, is expressed within the macrogamete and associated with oocyst wall formation in *Toxoplasma gondii*. *Int. J. Parasitol.*, 2000, 30, 1203-1209
- FERGUSON, D.J.P., HUTCHISON, W.M., DUNACHIE, J.F., SIIM, J.C. Ultrastructural study of early stages of asexual multiplication and microgametogony of *Toxoplasma gondii* in the small intestine of the cat. *Acta Path. Microbiol. Scand. [B]*, 1974, 82, 167-181
- FERGUSON, D.J.P., HUTCHISON, W.M., SIIM, L.C. The ultrastructural development of the macrogamete and formation of the oocyst wall of *Toxoplasma gondii*. *Acta Path. Microbiol. Scand. [B]*, 1975, 83, 491-505



- FERGUSON, D.J.P., HUTCHISON, W.M., DUNACHIE, J.F., SIIM, J.C. The effect of endo-enteric development of *Toxoplasma gondii* on the ultrastructure of epithelial cells of the small intestine of infected cat. *Acta Path. Microbiol. Scand. [B]*, 1976, 84, 189-195
- FERGUSON, D.J.P., BIRCH-ANDERSEN, A., SIIM, J.C., HUTCHISON, W.M. Ultrastructural studies on the sporulation of oocysts of *Toxoplasma gondii*. I. Development of the zygote and formation of the sporoblasts. *Acta Path. Microbiol. Scand. [B]*, 1979a, 87, 171-181
- FERGUSON, D.J.P., BIRCH-ANDERSEN, A., SIIM, J.C., HUTCHISON, W.M. Ultrastructural studies on the sporulation of oocysts of *Toxoplasma gondii*. II. Formation of the sporocyst and structure of the sporocyst wall. *Acta Path. Microbiol. Scand. [B]*, 1979b, 87, 183-190
- FERGUSON, D.J.P., BIRCH-ANDERSEN, A., SIIM, J.C., HUTCHISON, W.M.. Ultrastructural studies on the sporulation of oocysts of *Toxoplasma gondii*. III. Formation of the sporozoites within the sporocysts. *Acta Path. Microbiol. Scand. [B]*, 1979c, 87, 253-260
- FERGUSON, D.J.P., BIRCH-ANDERSEN, A., SIIM, J.C., HUTCHISON, W.M. An ultrastructural study on the excystation of the sporozoites of *Toxoplasma gondii*. *Acta Path. Microbiol. Scand. [B]*, 1979d, 87, 277-283
- FERGUSON, D.J.P., CESBRON-DELAUW, M.F., DUBREMETZ, J.F., SIBLEY, L.D., JOINER, K.A., WRIGHT, S. The expression and distribution of dense granule protein in the enteric (coccidian) forms of *Toxoplasma gondii* in the small intestine of the cat. *Exp. Parasitol.*, 1999, 91, 203-211
- FETTERER, R.H., BARFIELD, R.C. Characterization of a developmentally regulated oocyst protein from *Eimeria tenella*. *J. Parasitol.*, 2003, 89, 553-564
- FLECK, D.G., CHESSUM, B.S., PERKINS, M. Coccidian-like nature of *Toxoplasma gondii*. *B.M.J.*, 1972, 3, 111-112
- FREIRE-SANTOS, F., OTEIZA-LÓPEZ, A.M., VERGARA-CASTIBLANCO, C.A., ARES-MAZÁS, E. Study of the combined influence of environmental factors on viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts in water evaluated by fluorogenic vital dyes and excystation techniques. *Vet. Parasitol.*, 2000a, 89, 253-259.
- FREIRE-SANTOS, F., OTEIZA-LÓPEZ, A.M., VERGARA-CASTIBLANCO, C.A., ARES-MAZÁS, E., ALVAREZ-SUÁREZ, E., GARCÍA-MARTÍN, O. Detection of *Cryptosporidium* oocysts in bivalve molluscs destined for human consumption. *J. Parasitol.*, 2000b, 86, 853-854
- FRENKEL, J.K., DUBEY, J.P. Toxoplasmosis and its prevention in cats and man. *J. Infect. Dis.*, 1972, 126, 664-673
- FRENKEL, J.K., DUBEY, J.P. Effects of freezing on the viability of *Toxoplasma* oocysts. *J. Parasitol.*, 1973, 59, 587-588
- FRENKEL, J.K., SMITH, D.D. Immunization of cats against shedding of *Toxoplasma gondii*. *J. Parasitol.*, 1982, 68, 744-748

- FRENKEL, J.K., HASSANEIN, K.M., HASSANEIN, R.S., BROWN, E., THULLIEZ, P., QUINTERO-NUNEZ, R. Transmission of *Toxoplasma gondii* in Panama City, Panama: a five-year prospective cohort study of children, cats, rodents, birds. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1995, 53, 458-468
- FRENKEL, J.K., RUIZ, A., CHINCHILLA, M. Soil survival of *Toxoplasma* oocysts in Kansas and Costa Rica. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1975, 24, 439-443
- FREYRE, A., FALCON, J. Massive excystation of *Toxoplasma gondii* sporozoites. *Exp. Parasitol.*, 2004, 107, 72-77
- FREYRE, A., BONINO, J., FALCON, J., CASTELLS, D., CORREA, O., CASARETTO, A. The incidence and economic significance of ovine toxoplasmosis in Uruguay. *Vet. Parasitol.*, 1997, 73, 13-15
- FROSTEGARD, A., COURTOIS, S., RAMISSE, V., CLERC, S., BERNILLON, D., LE GALL, F., JEANNIN, P., NESME, X., SIMONET, P. Quantification of bias related to the extraction of DNA directly from soils. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1999, 65, 5409-5420
- FUENTES, I., MONTOYA, A., GARCIA-PEREZ, A.L., RAMIREZ, C., RODRIGUEZ, M., BARANDIKA, J.F., RUBIO, J.M. Genotypic characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from ovine in Spain: natural abortion versus asymptomatic adults. *IX European Multicolloquium of Parasitology* (Valencia, Spain, 2004).
- GHOSN, J., PARIS, L., AJZENBERG, D., CARCELAIN, G., DARDÉ, M.L., TUBIANA, R., BOSSI, P., BRICAIRE, F., KATLAMA, C. Atypical toxoplasmic manifestation after discontinuation of maintenance therapy in a human immunodeficiency virus type 1-infected patient with immune recovery. *Clin. Infect. Dis.*, 2003, 37, 112-114
- GRIGG, M.E., GANATRA, J., BOOTHROYD, J.C., MARGOLIS, T.P. Unusual abundance of atypical strains associated with human ocular toxoplasmosis. *J. Infect. Dis.*, 2001, 184, 633-639
- GROSS, U., BORMUTH, H., GAISSMAIER, C., DITTRICH, C., KRENN, V., BOHNE, W., FERGUSON, D.J.P. Monoclonal rat antibodies directed against *Toxoplasma gondii* suitable for studying tachyzoite-bradyzoite interconversion in vivo. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 1995, 2, 542-548
- GUILLOT, B., DESMONTS, G. Diagnostic séologique de la toxoplasmose – essai d'application aux animaux de boucherie. *Recueil de médecine vétérinaire de l'Ecole d'Alfort*, 1960, 136, 383-398
- HALL, S.M., PANDIT, A., GOLWILKAR, A., WILLIAMS, T.S. How do Jains get *Toxoplasma* infection? *Lancet*, 1999, 354, 486-487.
- HALLIER-SOULIER, S., GUILLOT, E. Detection of cryptosporidia and *Cryptosporidium parvum* oocysts in environmental water samples by immunomagnetic separation-polymerase chain reaction. *J. Appl. Microbiol.*, 2000, 89, 5-10.
- HARLOW, E., LANE, D., 1988. Antibodies: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.

- HARRIS, J.R., PETRY, F. *Cryptosporidium parvum*: structural components of the oocyst wall. *J. Parasitol.*, 1999, 85, 839-849
- HIMY-DAHAN, R., HEINRICH, A., FERRY, R., KEIN, T., KREMER, R. La toxoplasmose humaine et animale dans la région strasbourgeoise en 1980. Modifications observées depuis 1970. *Méd. Mal. Infect.*, 1983, 13, 457-459
- HOLLAND, G.N. Ocular toxoplasmosis: a global reassessment. Part I : Epidemiology and course of disease. *Am. J. Ophthalmol.*, 2003, 136, 973-988.
- HOMAN, W.L., VERCAMMEN, M., DE BRAEKELEER, J., VERSCHUEREN, H. Identification of a 200- to 300-fold repetitive 529 bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and its use for diagnostic and quantitative PCR. *Int. J. Parasitol.*, 2000, 30, 69-75
- HOWE, D.K., SIBLEY, L.D. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *J. Infect. Dis.*, 1995, 172, 1561-1566.
- HURTADO, A., ADURIZ, G., MORENO, B., BARANDIKA, J., GARCIA-PEREZ, A.L. Single tube nested PCR for the detection of *Toxoplasma gondii* in fetal tissues from naturally aborted ewes. *Vet. Parasitol.*, 2001, 102, 17-27
- HSU, B.M., HUANG, C. Performances of the immunomagnetic separation method for *Cryptosporidium* in water under various operation conditions. *Biotechnol. Prog.*, 2001, 17, 1114-1118
- HUTCHISON, W.M. The nematode transmission of *Toxoplasma gondii*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1967, 61, 80-89
- HUTCHISON, W.M., DUNACHIE, J.F., WORK, K., SIIM, J.C. The life cycle of the coccidian parasite, *Toxoplasma gondii*, in the domestic cat. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1971, 65, 380-399
- INOUE, M., RAI, S.K., ODA, T., KIMURA, K., NAKANISHI, M., HOTTA, H, UGA, S. A new filter-eluting solution that facilitates improved recovery of *Cryptosporidium* oocysts from water. *J. Microbiol. Methods*, 2003, 55, 679-686
- ISAAC-RENTON, J., BOWIE, W.R., KING, A., IRWIN, G.S., ONG, C.S., FUNG, C.P., SHOKEIR, M.O., DUBEY, J.P. Detection of *Toxoplasma gondii* oocysts in drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1998, 64, 2278-2280.
- ITO, S., TSUNODA, K., SHIMADA, K., TAKI, T., MATSUI, T. Disinfectant effects of several chemicals against *Toxoplasma* oocysts. *Nippon Juigaku Zasshi*, 1975, 37, 229-234
- JACKSON, M.H., HUTCHISON, W.M. The prevalence and source of *Toxoplasma* infection in the environment. In: Baker, JR, & Muller, R (Eds). *Advances in Parasitology*. Academic Press, 1989, pp. 55-105
- JACOBS, L., REMINGTON, J.S., MELTON, M.L. A survey of meat samples from swine, cattle and sheep for the presence of encysted *Toxoplasma*. *J. Parasitol.*, 1960, 46, 23-28

- JEWELL, M.L., FRENKEL, J.K., JOHNSON, K.M., REED, V., RUIZ, A. Development of *Toxoplasma* oocysts in neotropical felidae. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1972, 21, 512-517
- JOHNSON, D.W., PIENIAZEK, N.J., GRIFFIN, D.W., MISENER, L., ROSE, J.B. Development of a PCR protocol for sensitive detection of *Cryptosporidium* oocysts in water samples. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1995, 61, 3849-3855
- JOUVENTIN, P., MICOL, T., VERHEYDEN, C., GUEDON, G. Le ragondin. Biologie et méthodes de limitation des populations. Acta Publications, 1996, 155 pages
- JUNGERSEN, G., JENSEN, L., RASK, M.R., LIND, P. Non-lethal infection parameters in mice separate sheep type II *Toxoplasma gondii* isolates by virulence. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, 2002, 25, 187-195
- KANETO, C.N., COSTA, A.J., PAULILLO, A.C., MORAES, F.R., MURAKAMI, T.O., MEIRELES, M.V. Experimental toxoplasmosis in broiler chicks. *Vet. Parasitol.*, 1997, 69, 203-210
- KARIM, M.J., BASAK, S.C., TREES, A.J. Characterization and immunoprotective properties of a monoclonal antibody against the major oocyst wall protein of *Eimeria tenella*. *Infect. Immun.*, 1996, 64, 1227-1232.
- KASPER, L.H., WARE, P.L. Recognition and characterization of stage-specific oocyst/sporozoite antigens of *Toxoplasma gondii* by human antisera. *J. Clin. Invest.*, 1985, 75, 1570-1577
- KASPER, L.H., BRADLEY, M.S., PFEFFERKORN, E.R. Identification of stage-specific sporozoite antigens of *Toxoplasma gondii* by monoclonal antibodies. *J. Immunol.*, 1984, 132, 443-449.
- KAUCNER, C., STINEAR, T. Sensitive and rapid detection of viable *Giardia* cysts and *Cryptosporidium parvum* oocysts in large-volume water samples with wound fiberglass cartridge filters and reverse transcription-PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1998, 64, 1743-1749.
- KIKUCHI, Y., CHOMEL, B.B., KASTEN, R.W., MARTENSON, J.S., SWIFT, P.K., O'BRIEN, S.J. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in American free-ranging or captive pumas (*Felis concolor*) and bobcats (*Lynx rufus*). *Vet. Parasitol.*, 2004, 120, 1-9
- KILANI, R.T., SEKLA, L. Purification of *Cryptosporidium* oocysts and sporozoites by cesium chloride and Percoll gradients. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1987, 36, 505-508
- KNIEL, K.E., LINDSAY, D.S., SUMNER, S.S., HACKNEY, C.R., PIERSON, M.D., DUBEY, J.P. Examination of attachment and survival of *Toxoplasma gondii* oocysts on raspberries and blueberries. *J. Parasitol.*, 2002, 88, 790-793
- KOURENTI, C., HECKEROTH, A., TENTER, A., KARANIS, P. Development and application of different methods for the detection of *Toxoplasma gondii* in water. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2003, 69, 102-106

- KOURENTI, C., KARANIS, P. Development of a sensitive polymerase chain reaction method for the detection of *Toxoplasma gondii* in water. *Water Sci. Technol.*, 2004, 50, 287-291.
- KREADER, C.A. Relief of amplification inhibition in PCR with bovine serum albumine or T4 gene 32 protein. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1996, 62, 1102-1106
- KUCZYNSKA, E., SHELTON, D.R. Method for detection and enumeration of *Cryptosporidium parvum* oocysts in feces, manures, and soils. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1999, 65, 2820-2826.
- KUHN, R.C., ROCK, C.M., OSHIMA, K.H. Effects of pH and magnetic material on immunomagnetic separation of *Cryptosporidium* oocysts from concentrated water samples. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2002, 68, 2066-2070
- KUTIČIČ, V., WIKERHAUSER, T. Studies of the effect of various treatments on the viability of *Toxoplasma gondii* tissue cysts and oocysts. *Curr. Trop. Microbiol. Immunol.*, 1996, 219, 261-265.
- LABELLE, P., DUBEY, J.P., MIKAELIAN, I., BLANCHETTE, N., LAFOND, R., ST-ONGE, Q., MARTINEAU, D. Seroprevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in lynx (*Lynx canadensis*) and bobcats (*Lynx rufus*) from Québec, Canada. *J. Parasitol.*, 2001, 87, 1194-1195
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, 227, 680-685
- LAURENSOU, A. Fréquence de la toxoplasmose chez les bovins, ovins et porcins en Limousin. Thèse d'exercice de Médecine. Université de Limoges, 1987, 138 pages
- LECHEVALLIER, M.W., NORTON, W.D., SIEGEL, J.E., ABBASZADEGAN, M. Evaluation of the immunofluorescence procedure for detection of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in water. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1995, 61, 690-697
- LEGAY, J.M. Sur une tentative d'estimation du nombre total de chats domestiques. *C.R. Acad. Sc. Paris*, 1986, 17, 709-712
- LEHMANN, T., BLACKSTON, C.R., PARMLEY, S.F., REMINGTON, J.S., DUBEY, J.P. Strain typing of *Toxoplasma gondii*: comparison of antigen-coding and housekeeping genes. *J. Parasitol.*, 2000, 86, 960-971
- LEHMANN, T., GRAHAM, D.H., DAHL, E.R., BAHIA-OLIVEIRA, L.M.G., GENNARI, S.M., DUBEY, J.P. Variation in the structure of *Toxoplasma gondii* and the roles of selfing, drift, and epistatic selection in maintaining linkage disequilibria. *Infect. Genet. Evol.*, 2004, 4, 107-114.
- LEHMANN, T., GRAHAM, D.H., DAHL, E., SREEKUMAR, C., LAUNER, F., CORN, J.L., GAMBLE, H.R., DUBEY, J.P. Transmission dynamics of *Toxoplasma gondii* on a pig farm. *Infect. Genet. Evol.*, 2003, 3, 135-141

- LERHER, S.S., FASMAN, G.D. Ultraviolet irradiation effects in poly-L-tyrosine and model compounds. Identification of bityrosine as a photoproduct. *Biochemistry*, 1967, 6, 757-767.
- LIAO, S.F., DU, C., YANG, S., HEALEY, M.C. Alteration of *Cryptosporidium parvum* (Apicomplexa: Eucoccidiorida) oocyst antigens following bleach treatment. *Acta Protozool.*, 2001, 40, 273-279.
- LINDQUIST, H.D., BENNETT, J.W., HESTER, J.D., WARE, M.W., DUBEY, J.P., EVERSON, W.V. Autofluorescence of *Toxoplasma gondii* and related coccidian oocysts. *J. Parasitol.*, 2003, 89, 865-867
- LINDSAY, D.S., BLAGBURN, B.L., DUBEY, J.P. Survival of nonsporulated *Toxoplasma gondii* oocysts under refrigerator conditions. *Vet. Parasitol.*, 2002, 103, 309-313.
- LINDSAY, D.S., COLLINS, M.C., FLICK, G.J., DUBEY, J.P. Effects of high pressure processing on infectivity of *Toxoplasma gondii* oocysts for mice. Joint meeting American Association of Veterinary Parasitologists and American Society of Parasitologists. (Philadelphia, PA, July 2004a).
- LINDSAY, D.S., COLLINS, M.V., MITCHELL, S.M., COLE, R.A., FLICK, G.J., WETCH, C.N., LINDQUIST, A., DUBEY, J.P. Sporulation and survival of *Toxoplasma gondii* oocysts in seawater. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 2003, 50S, 687-688.
- LINDSAY, D.S., COLLINS, M.V., MITCHELL, S.M., WETCH, C.N., ROSYPAL, A.C., FLICK, G.J., ZAJAC, A.M., LINDQUIST, A., DUBEY, J.P. Survival of *Toxoplasma gondii* oocysts in eastern oysters (*Crassostrea virginica*). *J. Parasitol.*, 2004b, 90, 1054-1057
- LINDSAY, D.S., DUBEY, J.P., BLAGBURN, B.L. *Toxoplasma gondii* infections in red-tailed hawks inoculated orally with tissue cysts. *J. Parasitol.*, 1991, 77, 322-327
- LINDSAY, D.S., PHELPS, K.K., SMITH, S.A., FLICK, G., SUMNER, S.S., DUBEY, J.P. Removal of *Toxoplasma gondii* oocysts from sea water by eastern oysters (*Crassostrea virginica*). *J. Eukaryot. Microbiol.*, 2001, Suppl, 197S-198S.
- LINDSAY, D.S., SMITH, P.C., HOERR, F.J., BLAGBURN, B.L. Prevalence of encysted *Toxoplasma gondii* in raptors from Alabama. *J. Parasitol.*, 1993, 79, 870-873
- LUKESOVA, D., LITERAK, I. Shedding of *Toxoplasma gondii* oocysts by felidae in zoos in the Czech Republic. *Vet. Parasitol.*, 1998, 74, 1-7
- MARQUARDT, W.C. Host and site specificity in the coccidia. In: Hammond, DM, & Long, PL (Eds). *The Coccidia*. University Park Press, Baltimore, 1973, pp. 23-43.
- MARSHALL, P.A., HUGHES, J.M., WILLIAMS, R.H., SMITH, J.E., MURPHY, R.G., HIDE, G. Detection of high levels of congenital transmission of *Toxoplasma gondii* in natural urban populations of *Mus domesticus*. *Parasitology*, 2004, 128, 39-42
- MARTROU, P., PESTRE-ALEXANDRE, M., LOUBET, R., NICOLAS, J.A., MALINVAUD, G. La toxoplasmose congénitale (note concernant un cas mortel). *Limousin Médical*, 1965, 53, 3-7

- MASALA, G., PORCU, R., MADAU, L., TANDA, A., IBBA, B., SATTA, G., TOLA, S. Survey of ovine and caprine toxoplasmosis by IFAT and PCR assays in Sardinia, Italy. *Vet. Parasitol.*, 2003, 117, 15-21.
- MATSUO, J., KIMURA, D., RAI, S.K., KUMA, S. Detection of *Toxoplasma* oocysts from soil by modified sucrose flotation and PCR methods. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health*, 2004, 35, 270-274.
- McCOLGAN, C., BUXTON, D., BLEWETT, D.A. Titration of *Toxoplasma gondii* oocysts in non-pregnant sheep and the effects of subsequent challenge during pregnancy. *Vet. Rec.*, 1988, 123, 467-470
- McCUIN, R.M., CLANCY, J.L. Modifications to United States environmental protection agency methods 1622 and 1623 for detection of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in water. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2003, 69, 267-274
- McCUIN, R.M., BUKHARI, Z., SOBRINHO, J., CLANCY, J.L. Recovery of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts from source water concentrates using immunomagnetic separation. *J. Microbiol. Methods*, 2001 45, 69-76.
- McDONALD, V., DEER, R.M.A., NINA, J.M.S., WRIGHT, S., CHIODINI, P.L., McADAM, K.P.W.J. Characteristics and specificity of hybridoma antibodies against oocyst antigens of *Cryptosporidium parvum* from man. *Parasite Immunol.*, 1991, 13, 251-259
- McKENZIE, W.R., HOXIE, N.J., PROCTOR, M.E., GRADUS, M.S., BLAIR, K.A., PETERSON, D.E., KAZMIERCZAK, J.J., ADDISS, D.G., FOX, K.R., ROSE, J.B. et al. A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. *N. Engl. J. Med.*, 1994, 331, 161-167
- MILLER, M.A., GARDNER, I.A., KREUDER, C., PARADIES, D.M., WORCESTER, K.R., JESSUP, D.A., DODD, E., HARRIS, M.D., AMES, J.A., PACKHAM, A.E., CONRAD, P.A. Coastal freshwater runoff is a risk factor for *Toxoplasma gondii* infection of southern sea otters (*Enhydra lutris nereis*). *Int. J. Parasitol.*, 2002, 32, 997-1006.
- MILLER, M.A., GRIGG, M.E., KREUDER, C., JAMES, E.R., MELLI, A.C., CROSBIE, P.R., BOOTHROYD, J.C., BROWNSTEIN, D., CONRAD, P.A. An unusual genotype of *Toxoplasma gondii* is common in California sea otters (*Enhydra lutris nereis*) and is a cause of mortality. *Int. J. Parasitol.*, 2004, 34, 275-284.
- MILLER, N.L., FRENKEL, J.K., DUBEY, J.P. Oral infections with *Toxoplasma* cysts and oocysts in felines, other mammals and in birds. *J. Parasitol.*, 1972, 58, 928-937.
- MONDRAGON, R., HOWE, D.K., DUBEY, J.P., SIBLEY, L.D. Genotypic analysis of *Toxoplasma gondii* isolates from pigs. *J. Parasitol.*, 1998, 84, 639-641
- MONIS, P.T., SAINT, C.P. Development of a nested-PCR assay for the detection of *Cryptosporidium* in finished water. *Water Res.*, 2001, 35, 1641-1648
- MONTOYA, A., MIRO, G., JIMENEZ, S., MATEO, M., FRISUELOS, C., RAMIREZ, C., FUENTES, I. Genotypic characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from stray, farm, and

household cats in Spain. *IX European Multicolloquium of Parasitology* (Valencia, Spain, 2004)

MOUAFO, A.N., WECK-HEIMANN, A., DUBREMETZ, J.F., ENTZEROTH, R. Monoclonal antibodies specific for the two types of wall-forming bodies of *Eimeria tenella* macrogametes (Coccidia, Apicomplexa). *Parasitol. Res.*, 2002, 88, 217-224

MOUNIER, M. Etude expérimentale de la toxoplasmose : à propos de quatre souches isolées chez l'homme et chez l'animal. Thèse de doctorat. Université de Limoges, 1982, 330 pages

MUSIAL, C.E., ARROWOOD, M.J., STERLING, C.R., GERBA, C.P. Detection of *Cryptosporidium* in water by using polypropylene cartridge filters. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1987, 53, 687-692

NIEMINSKI, E.C., SCHAEFER III, F.W., ONGERTH, J.E. Comparison of two methods for detection of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in water. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1995, 61, 1714-1719

OLSVIK, O., POPOVIC, T., SKJERVE, E., CUDJOE, K.S., HORNES, E., UGELSTAD, J., UHLEN, M. Magnetic separation techniques in diagnostic microbiology. *Clin. Microbiol. Rev.*, 1994, 7, 43-54

ORLANDI, P.A., LAMPEL, K.A. Extraction-free, filter-based template preparation for rapid and sensitive PCR detection of pathogenic parasitic protozoa. *J. Clin. Microbiol.*, 2000, 38, 2271-2277.

ORTEGA, Y.R., GILMAN, R.H., STERLING, C.R. A new coccidian parasite (Apicomplexa: Eimeriidae) from humans. *J. Parasitol.*, 1994, 80, 625-629

OWEN, M.R., TREES, A.J. Genotyping of *Toxoplasma gondii* associated with abortion in sheep. *J. Parasitol.*, 1999, 85, 382-384.

OWEN, M.R., TREES, A.J. Vertical transmission of *Toxoplasma gondii* from chronically infected house (*Mus musculus*) and field (*Apodemus sylvaticus*) mice determined by polymerase chain reaction. *Parasitology*, 1998, 116, 299-304

PARMLEY, S.F., GROSS, U., SUCHARCZUK, A., WINDECK, T., SGARLATO, G.D., REMINGTON, J.S. Two alleles of the gene encoding surface antigen P22 in 25 strains of *Toxoplasma gondii*. *J. Parasitol.*, 1994, 80, 293-301

PEREIRA-BUENO, J., QUINTANILLA-GOZALO, A., PEREZ-PEREZ, V., ALVAREZ-GARCIA, G., COLLANTES-FERNANDEZ, E., ORTEGA-MORA, L.M. Evaluation of ovine abortion associated with *Toxoplasma gondii* in Spain by different diagnostic techniques. *Vet. Parasitol.*, 2004, 121, 33-43

PESTRE, M., MANDOUL, R., NICOLAS, J. Le mouton, réservoir du virus de la toxoplasmose: recherches sur les possibilités de la transmission de l'agent pathogène. *Bull. Soc. Path. Exot.*, 1962, 55, 789-797



- PESTRE-ALEXANDRE, M., DARDE, M.L., BOUTEILLE, B., BEN NACEUR, S., DESNOYERS, P., NICOLAS, J.A. Etude sérologique de la toxoplasmose chez le chat. *Bull. Soc. Fr. Parasitol.*, 1984, 2, 109-112
- PESTRE-ALEXANDRE, M., NICOLAS, J.A., MOUNIER, M., CHAUCHEF, S. La toxoplasmose ovine en France. Approche épidémiologique à propos de deux observations d'infection de troupeau. *Med. Mal. Inf.*, 1978, 8, 240-243
- PINAUD, E., KHAMLICHI, A.A., LE MORVAN, C., DROUET, M., NALESSO, V., LE BERT, M., COGNÉ, M., Localization of the 3' IgH locus elements that effect long-distance regulation of class switch recombination. *Immunity*, 2001, 15, 187-199
- QUINTERO-BETANCOURT, W., PEELE, E.R., ROSE, J.B. *Cryptosporidium parvum* and *Cyclospora cayetanensis*: a review of laboratory methods for detection of these waterborne parasites. *J. Microbiol. Methods*, 2002, 49, 209-224.
- RIAHI, H. *Hammondia hammondi*: études comparatives avec *Toxoplasma gondii*. Thèse de doctorat. Université de Limoges, 1997, 127 pages.
- RIAHI, H., LEBOUTET, M.J., LABROUSSE, F., BOUTEILLE, B., DARDÉ, M.L. Monoclonal antibodies to *Hammondia hammondi* allowing an immunological differentiation from *Toxoplasma gondii*. *J. Parasitol.*, 2000, 86, 1362-1366
- RADKE, J.R., GUBBELS, M.J., JEROME, M.E., RADKE, J.B., STRIEPEN, B., WHITE, M.W. Identification of a sporozoite-specific member of the *Toxoplasma* SAG superfamily via genetic complementation. *Mol. Microbiol.*, 2004, 52, 93-105
- RILEY, S.P.D., FOLEY, J., CHOMEL, B. Exposure to feline and canine pathogens in bobcats and gray foxes in urban and rural zones of a national park in California. *J. Wild. Dis.*, 2004, 40, 11-22
- ROBERTSON, L.J., GJERDE, B., CAMPBELL, A.T. Isolation of *Cyclospora* oocysts from fruits and vegetables using lectin-coated paramagnetic beads. *J. Food Protect.*, 2000, 63, 1410-1414
- ROCHELLE, P.A., DE LEON, R., STEWART, M.H., WOLFE, R.L. Comparison of primers and optimization of PCR conditions for detection of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* in water. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1997, 63, 106-114.
- ROCHELLE, P.A., DE LEON, R., JOHNSON, A., STEWART, M.H., WOLFE, R.L. Evaluation of immunomagnetic separation for recovery of infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts from environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1999, 65, 841-845.
- RODGERS, M.R., FLANIGAN, D.J., JAKUBOWSKI, W. Identification of algae which interfere with the detection of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts and a method for alleviating this interference. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1995, 61, 3759-3763
- ROGHMANN, M.C., FAULKNER, C.T., LEFKOWITZ, A., PATTON, S., ZIMMERMAN, J., MORRIS, J.G. Decreased seroprevalence for *Toxoplasma gondii* in Seventh Day Adventists in Maryland. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1999, 60, 790-792

- ROSE, J.B., LANDEEN, L.K., RILEY, K.R., GERNA, C.P. Evaluation of immunofluorescence techniques for detection of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts from environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1989, 55, 3189-3196
- RUIZ, A., FRENKEL, J.K. Intermediate and transport hosts of *Toxoplasma gondii* in Costa Rica. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1980, 29, 1161-1166
- RUIZ, A., FRENKEL, J.K., CERDAS, L. Isolation of *Toxoplasma* from soil. *J. Parasitol.*, 1973, 59, 204-206
- RYLEY, J.F. Cytochemistry, physiology, and biochemistry. In: Hammond, DM, & Long, PL (Eds). *The Coccidia*. University Park Press, 1973, Baltimore pp. 145-181.
- SABIN, A.B. Toxoplasmic encephalitis in children. *J. Am. Med. Assoc.*, 1941, 116, 801-807
- ŠAFARÍK, I., ŠAFARÍKOVÁ, M. Use of magnetic techniques for the isolation of cells. *J. Chromatogr. B*, 1999, 722, 33-53.
- SCHWAB, K.J., McDEVITT, J.J. Development of a PCR-enzyme immunoassay oligoprobe detection method for *Toxoplasma gondii* oocysts, incorporating PCR controls. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2003, 69, 5819-5825
- SEDLAK, K., LITERAK, I., BARTOVA, E., DVORAKOVA, H., BARTA, J. Susceptibility of the domestic duck (*Anas platyrhynchos*) to experimental infection with *Toxoplasma gondii* oocysts. *Avian Pathol.*, 2004, 33, 153-157
- SHEFFIELD, H.G., MELTON, M.L. Effects of pyrimethamine and sulfadiazine on the intestinal development of *Toxoplasma gondii* in cats. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1976, 25, 379-383
- SHENEP, J.L., BARENKAMP, S.J., BRAMMEIER, S.A., GARDNER, T.D. An outbreak of toxoplasmosis on an Illinois farm. *Pediatr. Infect. Dis.*, 1984, 3, 518-522
- SHEPHERD, K.M., WYN-JONES, A.P. An evaluation of methods for the simultaneous detection of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts from water. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1996, 62, 1317-1322.
- SHIELDS, J.M., OLSON, B.H. *Cyclospora cayentanensis*: a review of an emerging parasitic coccidian. *Int. J. Parasitol.*, 2003, 33, 371-391
- SILVA, J.C.R., OGASSAWARA, S., ADANIA, C.H., FERREIRA, F., GENNARI, S.M., DUBEY, J.P., FERREIRA-NETO, J.S. Seroprevalence in captive neotropical felids from Brazil. *Vet. Parasitol.*, 2001, 102, 217-224
- SIMMONS III, O.D., SOBSEY, M.D., HEANEY, C.D., SCHAEFFER III, F.W., FRANCY, D.S. Concentration and detection of *Cryptosporidium* oocysts in surface water samples by method 1622 using ultrafiltration and capsule filtration. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2001, 67, 1123-1127.

- SKJERVE, E., WALDELAND, H., NESBAKKEN, T., KAPPERUD, G. Risk factors for the presence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in Norwegian slaughter lambs. *Prev. Vet. Med.*, 1998, 35, 219-227.
- SLUTER, S.D., TZIPORI, S., WIDMER, G. Parameters affecting polymerase chain reaction detection of waterborne *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1997, 48, 325-330
- SMITH, D.D., FRENKEL, J.K. Cockroaches as vectors of *Sarcocystis muris* and other coccidia in the laboratory. *J. Parasitol.*, 1978, 64, 315-319
- SPEER, C.A., DUBEY, J.P. Ultrastructural differentiation of *Toxoplasma gondii* schizonts (types B to E) and gamonts in the intestines of cats fed bradyzoites. *Int. J. Parasitol.*, 2005, 35, 193-206
- SPEER, C.A., CLARK, S., DUBEY, J.P. Ultrastructure of the oocysts, sporocysts, and sporozoites of *Toxoplasma gondii*. *J. Parasitol.*, 1998, 84, 505-512
- SPEER, C.A., THAMMANA, P., SCHENKEL, R.H. Ultrastructural localization of antigenic sites on sporozoites, sporocysts, and oocysts of *Eimeria acervulina* and *Eimeria tenella* by monoclonal IgG and IgM antibodies. *J. Parasitol.*, 1989, 75, 92-97
- SPEER, C.A., TILLEY, M., TEMPLE, M.E., BLIXT, J.A., DUBEY, J.P., WHITE, M.W. Sporozoites of *Toxoplasma gondii* lack dense-granule protein GRA3 and form a unique parasitophorous vacuole. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 1995, 75, 75-86
- SREEKUMAR, C., GRAHAM, D.H., DAHL, E., LEHMANN, T., RAMAN, M., BHALERAO, D.P., VIANNA, M.C.B., DUBEY, J.P. Genotyping of *Toxoplasma gondii* from chickens from India. *Vet. Parasitol.*, 2003, 118, 187-194.
- STAGNO, S., DYKES, A.C., AMOS, C.S., HEAD, R.A., JURANEK, D.D., WALLS, K. An outbreak of toxoplasmosis linked to cats. *Pediatrics*, 1980, 65, 706-711.
- STURBAUM, G.D., ORTEGA, Y.R., GILMAN, R.H., STERLING, C.R., CABRERA, L., KLEIN, D.A. Detection of *Cyclospora cayentanensis* in wastewater. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1998, 64, 2284-2286.
- SU, C., EVANS, D., COLE, R.H., KISSINGER, J.C., AJIOKA, J.W., SIBLEY, L.D. Recent expansion of *Toxoplasma* through enhanced oral transmission. *Science*, 2003, 299, 414-416.
- SZABO, K.A., MENSE, M.G., LIPSCOMB, T.P., FELIX, K.J., DUBEY, J.P. Fatal toxoplasmosis in a bald eagle (*Haliaeetus leucocephalus*). *J. Parasitol.*, 2004, 90, 907-908.
- TAVERNE, J. Toxoplasmosis in Brazil (In brief). *Trends Parasitol.*, 2002, 18, 203-204.
- TEMPLETON, T.J., LANCTO, C.A., VIGDOROVICH, V., LIU, C., LONDON, N.R., HADSALL, K.Z., ABRAHAMSEN, M.S. The *Cryptosporidium* oocyst wall protein is a member of a multigene family and has a homolog in *Toxoplasma*. *Infect. Immunity*, 2004, 72, 980-987

- TENTER, A.M., BARTA, J.R., BEVERIDGE, I., DUSZYNSKI, D.W., MEHLHORN, H., MORRISON, D.A., THOMPSON, R.C.A., CONRAD, P.A. The conceptual basis for a new classification of the coccidia. *Int. J. Parasitol.*, 2002, 32, 595-616.
- TENTER, A.M., HECKEROTH, A.R., WEISS, L.M. *Toxoplasma gondii* : from animals to humans. *Int. J. Parasitol.*, 2000, 30, 1217-1258.
- TEUTSCH, S.M., JURANEK, D.D., SULZER, A., DUBEY, J.P., SIKES, R.K. Epidemic toxoplasmosis associated with infected cats. *N. Engl. J. Med.*, 1979, 300, 695-699.
- THOMPSON, R.C.A. The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and giardiasis. *Vet. Parasitol.*, 2004, 126, 15-35
- TILLEY, M., FICHERA, M.E., JEROME, M.E., ROOS, D.S., WHITE, M.W. *Toxoplasma gondii* sporozoites form a transient parasitophorous vacuole that is impermeable and contains only a subset of dense-granule proteins. *Infect. Immunity*, 1997, 65, 4598-4605
- TOMAVO, S., FORTIER, B., SOETE, M., ANSEL, C., CAMUS, D., DUBREMETZ, J.F. Characterization of bradyzoite-specific antigens of *Toxoplasma gondii*. *Infect. Immun.*, 1991, 59, 37-50.
- USEPA. Method 1623: *Giardia* and *Cryptosporidium* in water by filtration/IMS/FA. United States Environmental Protection Agency. Office of Water, Washington, DC. EPA, 2001, 821-R01-025 <http://www.epa.gov/waterscience/methods/1623.pdf>.
- VARMA, M., HESTER, J.D., SCHAEFFER III, F.W., WARE, M.W., LINDQUIST, H.D.A. Detection of *Cyclospora cayetanensis* using a quantitative real-time PCR assay. *J. Microbiol. Methods*, 2003, 53, 27-36.
- VESEY, G., DEERE, D., WEIR, C.J., ASHBOLT, N., WILLIAMS, K.L., VEAL, D.A. A simple method for evaluating *Cryptosporidium*-specific antibodies used in monitoring environmental water samples. *Letters Appl. Microbiol.*, 1997, 25, 316-320
- VIEIRA DA SILVA, A., LANGONI, H. The detection of *Toxoplasma gondii* by comparing cytology, histopathology, bioassay in mice, and the polymerase chain reaction (PCR). *Vet. Parasitol.*, 2001, 97, 191-198
- VILLENA, I. Risques environnementaux parasitaires d'origine hydrique et incidence de *Toxoplasma gondii*. Thèse de doctorat. Université de Reims Champagne-Ardenne, 2004, 214 pages.
- VILLENA, I., AUBERT, D., GOMIS, P., FERTE, H., INGLARD, J.C., DENIS-BISIAUX, H., DONDON, J.M., PISANO, E., ORTIS, N., PINON, J.M. Evaluation of a strategy for *Toxoplasma gondii* oocysts detection in water. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2004, 70, 4035-4039.
- WALLACE, G.D. Intermediate and transport hosts in the natural history of *Toxoplasma gondii*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1973, 22, 456-464
- WARD, L.A., WANG, Y. Rapid methods to isolate *Cryptosporidium* DNA from frozen feces for PCR. *Diagn. Microbiol. Inf. Dis.*, 2001, 41, 37-42

- WARE, M.W., WYMER, L., LINDQUIST, H.D.A., SCHAEFER III, F.W. Evaluation of an alternative IMS dissociation procedure for use with Method 1622: detection of *Cryptosporidium* in water. *J. Microbiol. Methods*, 2003, 55, 575-583
- WEIGEL, R.M., DUBEY, J.P., DYER, D., SIEGEL, A.M. Risk factors for infection with *Toxoplasma gondii* for residents and workers on swine farms in Illinois. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1999, 60, 793-798.
- WEIR, C., VESEY, G., SLADE, M., FERRARI, B., VEAL, D.A., WILLIAMS K. An immunoglobulin G1 monoclonal antibody highly specific to the wall of *Cryptosporidium* oocysts. *Clin. Diag. Lab. Immunol.*, 2000, 7, 745-759.
- WIEDENMANN, A., KRÜGER, P., BOTZENHART, K. PCR detection of *Cryptosporidium parvum* in environmental samples – a review of published protocols and current developments. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 1998, 21,150-166.
- WILSON, I.G. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1997, 63, 3741-3751
- WOHLSSEN, T., BATES, J., GRAY, B., KATOULI, M. Evaluation of five membrane filtration methods for recovery of *Cryptosporidium* and *Giardia* isolates from water samples. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2004, 70, 2318-2322
- WYSS, R., SAGER, H., MULLER, N., INDERBITZIN, F., KONIG, M., AUDIGE, L., GOTTSTEIN, B. The occurrence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* as regards meat hygiene. *Schweiz Arch. Tierheilkd.*, 2000, 142, 95-108.
- YAKUB, G.P., STADTERMAN-KNAUER, K.L. Evaluation of immunomagnetic separation for recovery of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia duodenalis* from high-iron matrices. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000, 66, 3628-3631
- YILMAZ, S.M., HOPKINS, S.H. Effects of different conditions on duration of infectivity of *Toxoplasma gondii* oocysts. *J. Parasitol.*, 1972, 58, 938-939
- ZARLENGA, DS., TROUT, JM. Concentrating, purifying, and detecting waterborne parasites. *Vet. Parasitol.*, 2004, 126, 195-217
- ZARNKE, R.L., DUBEY, J.P., VER HOEF, J.M., McNAY, M.E., KWOK, O.C.H. Serologic survey for *Toxoplasma gondii* in lynx from interior Alaska. *J. Wild. Dis.*, 2001, 37, 36-38
- ZHANG, S.Y., WEI, M.X., ZHOU, Z.Y., YU, J.Y., SHI, X.Q. Prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in the sera of rare wildlife an the Shanghai Zoological Garden, People's Republic of China. *Parasitol. Int.*, 2000, 49, 171-174
- ZHAO, X., DUSZYNSKI, D.W., LOKER, E.S. A simple method of DNA extraction for *Eimeria* species. *J. Microbiol. Methods*, 2001, 44, 131-137.

# ANNEXES

# Annexe 1

## Position taxonomique de *Toxoplasma gondii*

(Tenter et al., 2002, d'après Lévine (1988) et Current (1990)).

Les taxons contenant des coccidies d'importance médicale et/ou vétérinaire sont grisés.

Kingdom **Protista**  
Subkingdom **Protozoa**  
Phylum **Apicomplexa**  
Class **Conoidasida**  
Subclass **Gregarinasina**  
Subclass **Coccidiasina**  
Order **Agamococcidiorida**  
Order **Ixorheorida**  
Order **Protococcidiorida**  
Order **Eucoccidiorida**  
Suborder **Adeleorina**  
Suborder **Eimeriorina**  
Family **Eimeriidae**  
Genus **Caryospora**  
Genus **Eimeria**  
Genus **Isospora**  
15 other genera  
Family **Cryptosporidiidae**  
Genus **Cryptosporidium**  
Family **Sarcocystidae**  
Subfamily **Sarcocystinae**  
Genus **Frenkelia**  
Genus **Sarcocystis**  
1 other genus  
Subfamily **Toxoplasmatinae**  
Genus **Besnoitia**  
Genus **Hammondia**  
Genus **Neospora**  
→ Genus **Toxoplasma**

## Annexe 2

### Souches et stades de *Toxoplasma gondii* utilisés au cours de ce travail.

Souche <sup>a</sup>	Génotype <sup>b</sup>	Virulence chez la souris <sup>c</sup>	Stade utilisé	Production au laboratoire	Domaines d'utilisation	Hôte (origine géographique)	Référence
<b>RH</b>	I	+	Tachyzoïte	Oui	ADHS	Homme (USA)	Sabin, 1941
<b>PRU</b>	II	-	Oocyste	Oui	Production AcM Expériences d'IMS	Homme (France)	Martrou et al., 1965
<b>M7741</b>	III	+/-	Oocyste	Non	Réactivité AcM	Mouton (USA)	Jacobs et al., 1960
<b>P89</b>	Recombinant	+/-	Oocyste	Oui	Réactivité AcM	Porc (USA)	Dubey, Thulliez et al., 1995
<b>GUY-02-KOE</b>	Atypique	+/-	Oocyste	Non	Réactivité AcM	Homme (Guyane française)	Carme et al., 2002
<b>TgCkCo24</b>	III <sup>†</sup>	+	Oocyste	Non	Réactivité AcM	Poulet (Colombie)	Dubey, Gomez, et al., 2005

<sup>a</sup> les oocystes de M7741 et GUY-02-KOE sont fournis par A. Freyre (Laboratoire de la Toxoplasmosse, Montevideo, Uruguay), ceux de TgCkCo24 par JP. Dubey (USDA, Beltsville, USA)

<sup>b</sup> d'après Carme et al. (2002) et Ajzenberg et al. (2004) sauf <sup>†</sup> typage unilocus par PCR-RFLP-*SAG2* (Dubey, Gomez, et al., 2005)

<sup>c</sup> (+) virulence, (-) avirulence, (+/-) virulence intermédiaire



## **Annexe 3**

### **Production d'antigènes figurés pour le test sérologique ADHS (selon Desmonts et Remington, 1980).**

Les tachyzoïtes RH sont cultivés dans la cavité intrapéritonéale de plusieurs souris en présence de cellules sarcomateuses TG180 pour obtenir un grand nombre de tachyzoïtes (jusqu'à  $1.10^9$  / souris)

#### ***J-12 : Entretien des cellules TG180***

- passage tous les 10-12 j par inoculation par voie i.p. de 0,1 ml de culot cellulaire / souris

#### ***J-3 : Entretien de la souche RH***

- passage tous les 2-3 jours par inoculation par voie i.p. de 0,5 ml d'ascite / souris

#### ***J0 : Co-infection tachyzoïtes- TG180 (transfert A)***

- l'ascite de RH est ponctionnée 2-3 j p.i. et la cavité péritonéale est lavée avec 3x1 ml de de NaCl 0,9%
- 2 ml d'ascite de TG180 sont ponctionnés à 10-12 j p.i.
- 2 ml d'ascite RH (à la concentration de ~40 tachyzoïtes / champ au x400) sont mélangés aux 2 ml d'ascite TG180 puis centrifugés à 700 g 10 min
- 3 souris sont inoculées par voie i.p. avec 0,2 ml du culot / souris

#### ***J+2 : Transfert B***

- l'ascite est ponctionnée, centrifugée et le stade d'infection des TG180 est déterminé (tableau 26)

- le culot de TG180 infectées est mélangé à un culot de cellules TG180 non infectées dans un ratio volume/volume qui dépend du stade d'infection (tableau 26). Seules les ascites de stades IV ou V doivent être utilisées pour le transfert B
- le mélange est centrifugé à 700 g 10 min et 10-12 souris sont inoculées par voie i.p. avec 0,2 ml du culot / souris

#### ***J+4 : Purification de l'antigène***

- les souris sont exsanguinées et leur ascite est ponctionnée. La cavité péritonéale est lavée avec 3x1 ml de PBS. Les TG180 doivent être aux stades IV ou V d'infection
- après centrifugation à 700 g 10 min, le culot est trypsiné pendant 30 min à 37°C sous agitation dans une solution contenant : 50 mg de trypsine, 0,4 ml d'héparine et 100 ml de PBS
- les tachyzoïtes sont lavés 3 fois en PBS à 700 g 10 min
- au final, les tachyzoïtes sont formolés dans une solution à 6% pendant au moins 16 h

#### ***J+5***

- le formol est éliminé par 3 lavages en PBS à 700 g 10 min
- la suspension, concentrée 20X, est conservée à 4°C en PBS contenant 0,1 % d'azide de sodium

#### ***Réaction d'ADHS***

- les sérums sont dilués dans 50 µl d'un mélange égal de PBS et de 2ME, dans des plaques de 96 puits à fond rond
- la suspension d'antigènes est diluée à 15 000 tachyzoïtes / µl dans un tampon BABS à pH 8,7 (bioMérieux)
- 50 µl de la suspension diluée sont ajoutés / puits

- les plaques sont agitées et le mélange est incubé pendant au moins 5 h à température ambiante, à l'abri de la dessiccation et des vibrations
- la lecture est faite après 5 à 24 h d'incubation

<b>Stades d'infection des TG180</b>	<b>Caractéristiques microscopiques</b>	<b>Ratio (v/v)<sup>a</sup> pour transfert B</b>
I	Pas d'infection	1/1
II	30% sont infectés	1/2
III	80% sont infectés	1 /4
IV	100% sont infectés – début de lyse cellulaire	<b>1/16</b>
V	70% de cellules lysées – libération massive de tachyzoïtes – quelques uns sont morts	<b>1/32</b>
VI	Lyse totale - 50% de tachyzoïtes morts	Ne pas utiliser

**Tableau 26 : Stades d'infection des TG180.** <sup>a</sup> respectivement volume de TG180 infectées / volume de TG180 provenant de souris non infectées.

## **Annexe 4**

### **Purification des oocystes de toxoplasme par flottation sur saccharose-phénol (Dumètre et Dardé, 2004).**

- 10 g de selles sont dilués dans 100 ml d'eau distillée-Tween-80 à 0,1%
- la solution est filtrée sur tamis métallique (porosité 500 µm) (500 g, 10 min)
- le culot est repris dans 5 volumes d'une solution de saccharose-phénol (400 g de saccharose, 8 g de phénol, qsp 1 L ED ; densité 1,15) puis centrifugé (1200 g, 10 min)
- environ 10 ml du surnageant sont collectés, dilués dans 5 volumes d'eau distillée puis centrifugés (1200 g, 10 min)
- le culot est repris dans quelques millilitres d'une solution d'acide sulfurique à 2%
- les oocystes sont sporulés pendant 7 jours à température ambiante dans un agitateur à 175 rpm. Certains lots d'oocystes n'ont pas subi de sporulation afin de disposer d'oocystes non sporulés. Les oocystes sporulés ou non sporulés ont été conservés à +4°C dans l'acide sulfurique à 2% jusqu'à utilisation.

## Annexe 5

### Solutions utilisées pour la purification des oocystes sur chlorure de césium

#### 1. Tampon Tris-EDTA (TE)

Tris (50 mM)	0,30 g
EDTA (10 mM)	0,19 g
ED	qsp 50 ml

(Ajuster à pH 7,2 par HCl concentré et filtrer sur 0,22  $\mu\text{m}$ . Conservation 2 mois à température ambiante)

#### 2. Solution stock de chlorure de césium (CsCl) (densité = 1,15)

(utiliser au minimum une qualité optique, ex. Sigma C3139)

CsCl	10,53 g
Tampon TE	qsp 50 ml

(Conservation 2 mois à température ambiante)

#### 3. Solutions diluées de CsCl

Densité	V <sub>SolStock</sub> (ml)	V <sub>TE</sub> (ml)	V <sub>final</sub> (ml)
1,10	10	5	15
1,05	5	10	15

## Annexe 6

**Protozoaires, évoqués dans ce travail, dont le cycle évolutif est caractérisé par la  
persistance d'un stade infectieux dans l'environnement.**

<b>Protozoaires</b>	<b>HD</b>	<b>HI</b>	<b>Cycle</b>	<b>Stade dans l'environnement (taille en µm)</b>	<b>Références</b>
<i>Toxoplasma gondii</i>	Félins	Tous les Homéothermes	Hétéroxène facultatif	Oocyste (13 x 11)	Dubey, 1996b
<i>Hammondia hammondi</i>	Chat	Rongeurs, chèvre	Hétéroxène obligatoire	Oocyste (14,6 x 11,6)	Dubey et Sreekumar, 2003
<i>Hammondia heydorni</i>	Canidés	?	Hétéroxène obligatoire	Oocyste (12 x 11)	Dubey, Barr et al., 2002
<i>Neospora caninum</i>	Canidés	Bovins	Hétéroxène facultatif	Oocyste (11,7 x 11,3)	Dubey, Barr et al., 2002
<i>Cyclospora cayetanensis</i>	Homme	NA <sup>a</sup>	Homoxène	Oocyste (8,6 x 8,6)	Ortega et al., 1997
<i>Eimeria maxima</i>	Poulet	NA	Homoxène	Oocyste (30 x 20)	Marquardt, 1973
<i>Eimeria tenella</i>	Poulet	NA	Homoxène	Oocyste (23 x 19)	Marquardt, 1973
<i>Cryptosporidium</i> sp.	Tous les vertébrés	NA	Homoxène	Oocyste (dimaètre 5-6)	Fayer, 2004
<i>Giardia intestinalis</i>	Tous les vertébrés	NA	Homoxène	Kyste (13,5 x 7)	Thompson, 2004

<sup>a</sup>NA : non applicable.

## Annexe 7

### Conditions de conservation des autres protozoaires utilisés au cours de ce travail.

Espèce	Stade	Milieu de conservation	Provenance
<i>Hammondia hammondi</i>	Oocyste	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> à 2%	Isolat HH34 –J.K. Frenkel Entretenu au laboratoire depuis 1989
<i>Hammondia heydorni</i>	Oocyste	K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> à 2%	Isolat Giessen1999 – G. Schares Institut d'épidémiologie Wusterhausen (Allemagne)
<i>Neospora caninum</i>	Oocyste	K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> à 2%	Isolat NcBrBuf-2 - J.P. Dubey USDA Beltsville (USA)
<i>Cyclospora cayetanensis</i>	Oocyste	K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> à 2,5%	Laboratoire de Parasitologie CHU Limoges (France)
<i>Eimeria tenella</i>	Oocyste	K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> à 2,5%	Don de P. Péry INRA Jouy-en-Josas (France)
<i>Eimeria maxima</i>	Oocyste	K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> à 2,5%	Don de M. Naciri INRA Nouzilly (France)
<i>Cryptosporidium</i> sp.	Oocyste	Formol à 10%	Laboratoire Vétérinaire Départemental de la Haute-Vienne - Limoges (France)
<i>Giardia intestinalis</i>	Kyste	Formol à 10%	Laboratoire de Parasitologie CHU Limoges (France)

## Annexe 8

### Références des réactifs utilisés pour déterminer l'isotype et la concentration des anticorps monoclonaux dans les surnageants de culture d'hybridomes.

---

<b>Anti-immunoglobulines non marquées</b>	<b>Référence</b>
	<b>(Southern Biotechnology Associates Inc.)</b>
Goat anti mouse IgM	1021-01
Goat anti mouse IgG1	1070-01
Goat anti mouse IgG2a	1080-01
Goat anti mouse IgG2b	1090-01
Goat anti mouse IgG3	1100-01

---

<b>Immunoglobulines contrôles</b>	
Mouse IgM	0101-01
Mouse IgG1	0102-01
Mouse IgG2a	0103-01
Mouse IgG2b	0104-01
Mouse IgG3	0105-01

---

<b>Anti-immunoglobulines marquées</b>	
<b>à la phosphatase alcaline</b>	
Goat anti mouse IgM – AP	1021-04
Goat anti mouse IgG1 – AP	1070-04
Goat anti mouse IgG2a – AP	1080-04
Goat anti mouse IgG2b – AP	1090-04
Goat anti mouse IgG3 – AP	1100-04

---



## Annexe 9

### Culture in vitro des stades asexués de *Toxoplasma gondii*.

#### A. Culture cellulaire de tachyzoïtes de la souche PRU sur cellules TGIH

Les cellules TGIH (cellules TG 180 adaptées in vitro, fournies par A. Puime de l'Institut d'Hygiène de Montevideo) sont préalablement cultivées en flasque de 75 cm<sup>2</sup> dans un milieu DMEM additionné de 5% de SVF à 37°C et sous 5% de CO<sub>2</sub>.

Les toxoplasmes sont isolés du cerveau d'une souris infectée 2 mois plus tôt selon la méthode de Blewett et al. (1983) :

- le cerveau est broyé finement dans 1 ml de PBS stérile à travers une seringue montée avec une aiguille de 19 gauges
- le volume de cette suspension est porté à 11,5 ml et transféré dans un tube de 30 ml à fond conique
- 1,5 ml d'une solution de Percoll isotonique dilué à 30% en DMEM sont ajoutés sous la suspension cérébrale avec une pipette Pasteur effilée
- 1,5 ml d'une solution de Percoll isotonique à 90% sont ajoutés sous la couche précédente
- le gradient est centrifugé à 1200 g, 15 min
- les kystes sont récupérés dans la couche de Percoll à 30% et sont lavés une fois dans du DMEM à 800 g 10 min
- le culot est repris dans 5 ml d'une solution de trypsine à 0,5% et cette suspension est agitée à 37°C pendant 10 min pour libérer les bradyzoïtes
- les bradyzoïtes sont lavés une fois en DMEM à 800 g, 10 min, puis sont déposés dans la flasque contenant les cellules TGIH

La co-culture est réalisée en DMEM-5% de SVF à 37°C sous 5% de CO<sub>2</sub>. Au bout de 10 jours, cellules et tachyzoïtes sont trypsinés puis lavés en DMEM : ils sont disponibles pour l'IFI.

## **B. Culture cellulaire de tachyzoïtes et de kystes de la souche PRU sur cellules LLCMK2**

Toutes les étapes de la culture se font en flasque de 75 cm<sup>2</sup> dans du DMEM-5%SVF.

Les cellules LLCMK2 fournies par J. Previato (Institut de Biophysique Carlos Chagas, Rio de Janeiro, Brésil) sont cultivées jusqu'à confluence avant d'être infectées.

Les flasques sontensemencées avec des tachyzoïtes obtenus sur culture TGIH comme précédemment, après filtration sur membrane de polycarbonate de 3 µm. La culture se fait en DMEM-2%SVF.

# Annexe 10

## Solutions utilisées pour le western-blot

### 1. Tampon de traitement (solution de Laemmli), conditions non réductrices

Tris-HCl pH 6,8	2,5 ml
SDS (60 mM)	1 g (2%)
Glycérol	5,8 ml (10%)
Bleu de bromophénol	0,5 ml (0,1%)
ED	qsp 50 ml

(En conditions réductrices, ajouter 5% de 2-ME à cette solution. Conservation 6 mois à  $-20^{\circ}\text{C}$ )

### 2. Solution monomère d'acrylamide

Acrylamide	29,1 g
Bis Acrylamide	0,9 g
ED	qsp 100 ml

(Filtrer à  $0,45\ \mu\text{m}$ , conservation 15 j à  $4^{\circ}\text{C}$ , à l'obscurité)

### 3. Tampon Tris-HCl (pH 8,8)

Tris (1,875 M)	11,36 g
ED	qsp 50 ml (Ajuster le pH par HCl)

#### 4. Tampon Tris-HCl (pH 6,8)

Tris (1,25 M)	7,56 g
ED	qsp 50 ml (Ajuster le pH par HCl)

#### 5. Quantité pour 2 gels de 8x8 cm et 0,75 mm d'épaisseur

	Gel de séparation			Gel de concentration <sup>a</sup>
Acrylamide (%)	7,5	<b>10</b>	12	
Acrylamide (n°2) (ml)	3,8	5	6	0,8
ED (ml)	8	6,8	5,8	3,6
Tris pH 8,8 (n°3) (ml)	3	3	3	-
Tris pH 6,8 (n°4) (ml)	-	-	-	0,5
<i>Dégazer pendant 30 min, ajouter au moment du coulage :</i>				
SDS 10 % (m/v) (µl)	150	150	150	50
TEMED (µl)	7,5	7,5	7,5	5
APS 10% (m/v) (µl)	50	50	50	17

<sup>a</sup> le gel de concentration doit être préparé après polymérisation du gel de séparation

#### 6. Tampon de migration 10X

Tris	30,3 g
Glycine	144,2 g
SDS	10 g
ED	qsp 1 L

(pH 8,3 sans ajuster. Conservation 2 mois à température ambiante. Diluer au 1/10 avant utilisation)

### **7. Tampon de transfert**

Tris (25 mM)	0,605 g	
Glycine (150 mM)	2,25 g	
Méthanol	20 ml (10%)	
ED	qsp 200 ml	(pH 8,3 sans ajuster)

### **8. Solution de révélation (à préparer extemporanément)**

3,3'-Diaminobenzidine (DAB)	5 mg
PBS	qsp 10 ml
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	10 µl

# Annexe 11

## Protocole du SDS-PAGE et du transfert des protéines d'oocystes de toxoplasme

### *SDS-PAGE*

- le gel de séparation à 10% d'acrylamide (annexe 10) est coulé dans une cuve verticale (Mighty Small II SE250, Hoefer Scientific Instruments, San Francisco). Les dimensions du gel sont de 8x8 cm et 0,75 mm d'épaisseur.
- après polymérisation (60 min), le gel de concentration à 5% d'acrylamide (annexe 10) est coulé sur le gel de séparation et un peigne à 10 dents y est inséré.
- après polymérisation (30 min), les plaques sont placées dans la cuve de migration. Les chambres, intérieure et extérieure, de la cuve sont remplies de tampon de migration (annexe 10).
- le peigne est retiré et les préparations antigéniques sont déposées dans les puits à raison de 10-15 µl/puits. Un standard de poids moléculaire (6,5-250 kDa, Sigma 4038) est également déposé dans un puits.
- les échantillons sont soumis à 90 min de migration sous une intensité de 40 mA (générateur Apelex PS202, Milian France SAS, Lyon) sous refroidissement. Lorsque le front de migration arrive à la base du gel, la migration est arrêtée et le gel est récupéré pour le transfert.

### *Transfert*

Il s'effectue sous l'influence d'un champ électrique qui permet le transfert des protéines séparées dans le gel placé vers la cathode (-) vers une membrane de nitrocellulose placée à l'anode (+). La cuve utilisée est la TransBlot SD (Bio-Rad, Marnes-la-Coquettes, France) :

- six feuilles de papier Whatman et une membrane de nitrocellulose (Immobilon NC, Millipore, St Quentin-en-Yvelines, France) sont découpées à la dimension du gel. Les feuilles sont trempées dans le tampon de transfert (annexe 10). Sur la plaque d'anode sont déposées successivement, en évitant toute bulle d'air :
  - trois feuilles Whatman
  - la membrane de nitrocellulose
  - le gel
  - trois feuilles Whatman
- la plaque cathode est ensuite déposée sur l'ensemble du sandwich. Une pression est maintenue par cette plaque pour assurer un bon transfert. Un système de refroidissement interne maintient une température de 2-8°C pendant le transfert.
- le transfert dure 90 min à 0,8 mA/cm<sup>2</sup> de gel sous un voltage maximal.
- après le transfert, la nitrocellulose est colorée au rouge Ponceau pour contrôler la qualité du transfert protéique, puis est découpée en bandelettes selon les pistes de migration. La bandelette de migration des poids moléculaires est séchée et conservée.

## **Annexe 12**

### **Couplage de l'anticorps 3G4 sur les billes Dynal M-450 Epoxy (selon le protocole fourni par Dynal Biotech.)**

- les billes, fournies à la concentration de  $4.10^8/ml$ , sont vortexées pendant 1 min
- 500  $\mu l$  de billes sont lavés 3x1 min dans un tampon phosphate 0,1M à pH 7,4
- les billes sont reprises dans 500  $\mu l$  de tampon phosphate contenant 100  $\mu g$  de 3G4 ; le mélange est incubé en agitation rotative lente à température ambiante pendant 20 min
- 20  $\mu l$  de tampon phosphate contenant 10% de BSA est ajouté pour favoriser une meilleure orientation des anticorps
- le mélange est incubé pendant 24 h à température ambiante
- les billes sont lavées 3x5 min en agitation douce à 4°C dans du PBS isotonique à pH 7,2
- les billes sont conservées dans du PBS contenant 0,02% d'azide de sodium.



## **Annexe 13**

### **Couplage d'anticorps sur les billes P.A.R.I.S. BM0829 (selon le protocole fourni par P.A.R.I.S. Biotech.)**

- les billes, fournies à la concentration de  $1,61.10^{10}$ /ml, sont vortexées pendant 1 min
- 100  $\mu$ l des billes sont incubés directement dans 500  $\mu$ l de surnageant de culture contenant 45  $\mu$ g de 3G4, en agitation rotative lente à température ambiante pendant 30 min
- les billes sont lavées 3x1 min dans du PBS contenant 0,1% de BSA
- les billes sont conservées dans du PBS.

## Annexe 14

### **Principe de recherche des oocystes de *Cryptosporidium* sp. et des kystes de *G. intestinalis* dans les eaux de surface (selon la norme AFNOR NF T90-455, AFNOR, 2001).**

Un protocole détaillé est disponible sur le site de l'Agence de Protection de l'Environnement Américaine (USEPA, 2001).

#### **Concentration des parasites**

- filtration d'un prélèvement à travers une cartouche Envirochek Standard (1 µm)
- élution par une solution de PBS (pH 7,4) contenant 0,01% de Tween-80 et 0,01% d'Antifoam B (Sigma A5757)
- centrifugation de l'éluat à 1250 g (30 min, 4°C, sans frein)

#### **Reconcentration par IMS**

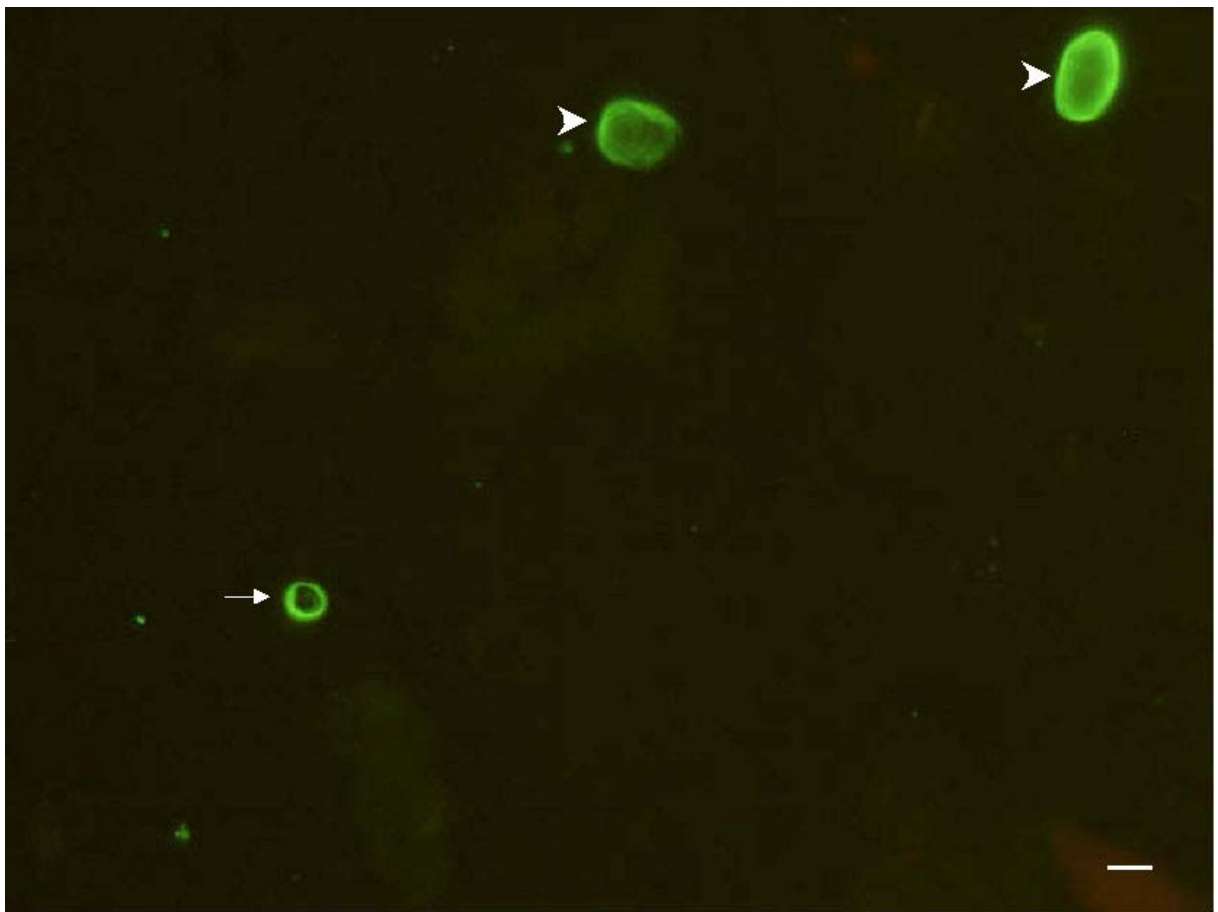
- le culot de centrifugation ( $\leq 0,5$  ml) est repris dans un volume maximal de 10 ml et les oocystes et les kystes sont incubés 60 min avec des billes magnétiques recouvertes d'anticorps spécifiques selon les recommandations du fournisseur (Kit Dynabeads® GC-Combo 730.02, Dynal Biotech., Compiègne, France)
- les complexes billes-parasites sont séparés des débris environnants par aimantation. Les complexes sont lavés plusieurs fois dans le cas des eaux de surface
- les complexes sont dissociés par ajout de HCl 0,1N puis les parasites élués sont neutralisés avec NaOH 1N

#### **Identification et numération par IF**

- les parasites, déposés sur lame, sont détectés par des anticorps spécifiques de la paroi des kystes de *Giardia* et des oocystes de cryptosporidie. Le kit de détection utilisé est

le kit Merifluor *Cryptosporidium*/*Giardia* (250050, Meridian Bioscience, Inc., Nice, France)

- l'identification et la numération sont réalisées au microscope à épifluorescence (filtre d'excitation, 450-480 nm ; miroir dichroïque, 500 nm ; filtre d'émission, 515 nm) à x400, et en contraste de phase (figure 26).



**Figure 25 : Oocyste de *Cryptosporidium* sp. (flèche) et kystes de *G. intestinalis* (têtes de flèche) après IMS et IF (x400, échelle = 5  $\mu$ m).**

## Annexe 15

### Recherche des kystes tissulaires de toxoplasme par digestion pepsique selon Dubey (1998c).

- pour 50 g de tissus musculaires ou de cerveau
- éliminer les tissus adipeux et conjonctifs et les gros vaisseaux
- couper en morceaux de 1 cm et broyer dans un blender
  - 15 s à faible vitesse
  - 30 s à vitesse maximum après ajout de 125 ml de NaCl 0,9%
- rincer le blender avec 125 ml supplémentaires
- préchauffer séparément à 37°C le broyat (250 ml) et la solution pepsique (250 ml) contenant :

pepsine (activité biologique 1:10 000 Sigma P7000)	1,3 g
NaCl	2,5 g
HCl concentré	3,5 ml
ED	qsp 250 ml
- mélanger volume/volume le broyat et la solution pepsique – incuber au bain-marie sous agitation pendant 1h à 37°C
- filtrer sur gaze et laver trois fois en NaCl 0,9% (1200 g, 10 min)
- reprendre le culot dans quelques millilitres de NaCl 0,9% contenant 40 mg de gentamycine/L
- inoculer par voie i.p. 0,5-1ml / souris.

## Annexe 16

Cartes de répartition des différents prélèvements d'eaux de surface réalisés entre mars et juillet 2005.

A. Répartition globale des 36 prélèvements effectués dans les départements 24 et 87 (le numéro du prélèvement est indiqué)



**B. Points de prélèvements dans une exploitation ovine ayant eu des antécédents récents de toxoplasme ( $\leq 3$  ans). Trois étangs sont situés (\*) à distance des bâtiments d'élevage (\*\*). Le plus grand des étangs est un site de piégeage de ragondins (cf. [site n°4, section 4.4.1.](#)).**



**C. Points de prélèvements dans une zone résidentielle urbaine de Limoges.**





**D. Points de prélèvements dans une zone résidentielle semi-urbaine.**



**E. Points de prélèvements dans une zone rurale, autour d'un point de nourrissage de chats errants (\*\*).**





**Figure 26 : Site dans lequel ont été détectés des oocystes de coccidies (PVT n°16 et 23).** Cette mare est régulièrement visitée par des chats. Le trop plein s'évacue par deux tuyaux (petites flèches) ou ruisselle dans un pré (grande flèche) pour s'acheminer dans deux étangs (PVT n°17 et 24) (cf. carte E, annexe 16).



# Annexe 17

## Tampons pour l'extraction de l'ADN des sporocystes de toxoplasme

### 1. Tampon SDS-EDTA-protéinase K

EDTA (660 mM)	6,14 g
SDS	0,25 g (1%)
Protéinase K à 20 mg/ml (Qiagen)	2,5 ml
ED	qsp 25 ml
Ajuster à pH 9,5	

### 2. Tampon CTAB

Hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB) (Sigma H6269)	0,5 g (2%)
NaCl (1,4 M)	2,05 g
EDTA (20 mM)	0,19 g
Tris (100 mM)	0,30 g
2-ME	50 µl
ED	qsp 25 ml



## Annexe 19

### Marqueurs génétiques utilisés pour le typage des isolats de toxoplasme (selon Ajzenberg et al., 2004).

<i>Marqueurs</i> (chromosome)	N° d'accèsion <sup>a</sup>	Fonction codante <sup>b</sup>	Séquences des primers <sup>c</sup>
<i>TUB2</i> (IX)	M20025, AY572562 → AY572604	Gène de la $\beta$ -tubuline	(F) 5' 6FAM-GTCCGGGTGTTCTACAAAA 3' (R) 5' TTGGCAAAGACGAAGTTGT 3'
<i>W35</i> (II)	W35487, AY572605 → AY572647	Inconnue (EST)	(F) 5' GGTTCACTGGATCTTCTCCAA 3' (R) 5' 6FAM-AATGAACGTCGCTTGTTTCC 3'
<i>TgM-A</i> (X)	Y17507, AY572649 → AY572691	Gène de la myosine A	(F) 5' GGCGTCGACATGAGTTTCTC 3' (R) 5' HEX-TGGGCATGTAAATGTAGAGATG 3'
<i>B18</i> (VII)	BM189462, AY572693 → AY572735	Inconnue (EST)	(F) 5' 6FAM-TGGTCTTCACCCTTTCATCC 3' (R) 5' AGGGATAAGTTTCTTCACAACGA 3'
<i>B17</i> (XII)	BM175053, AY572737 → AY572779	Inconnue (EST)	(F) 5' CGACAAGTCCATGCGAACTA 3' (R) 5' HEX-GGCAACAGGAGGTAGAGGAG 3'

<sup>a</sup> Numéro d'accèsion GenBank

<sup>b</sup> EST, Expressed Sequence Tags.

<sup>c</sup> F, forward primer; R, reverse primer

## Annexe 20

**Polymorphisme de longueur allélique pour cinq microsatellites considérés.**

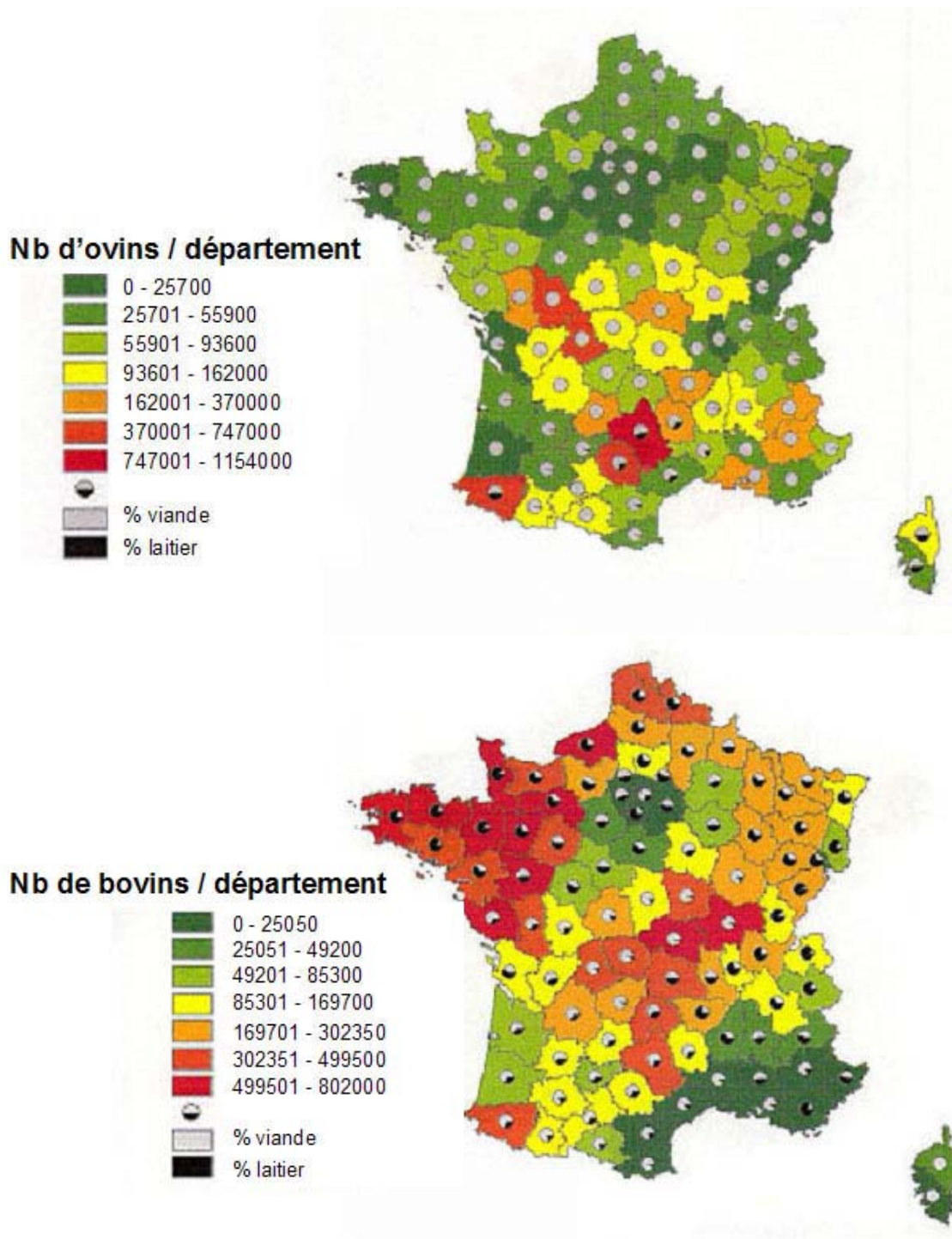
**Les toxoplasmes isolés au cours de ce travail sont de type II,**

**comme l'isolat de référence Me49**

Isolat de référence	Type	Polymorphisme de longueur allélique (pb)				
		<i>TUB2</i> [allele]	<i>W35</i> [allele]	<i>TgM-A</i> [allele]	<i>B18</i> [allele]	<i>B17</i> [allele]
BK	I	291 [1]	248 [1.6]	204 [1]	158 [1.3]	340 [1]
<b>Me49</b>	<b>II</b>	<b>289</b> <b>[2.3]</b>	<b>242</b> <b>[2.3.7]</b>	<b>202</b> <b>[2]</b>	<b>156</b> <b>[2]</b>	<b>334</b> <b>[2.3]</b>
NED	III	289 [2.3]	242 [2.3.7]	200 [3]	158 [1.3]	334 [2.3]
BOU	II*	289 [2.3]	244 [5]	202 [2]	156 [2]	334 [2.3]
RMS-2001-MAU	II/I* or II/III*	289 [2.3]	242 [2.3.7]	206 [5]	158 [1.3]	334 [2.3]
PSP-2003-KOM	I/III*	291 [1]	248 [1.6]	200 [3]	158 [1.3]	340 [1]
GUY-2002-KOE	Atypique	291 [1]	242 [2.3.7]	198 [4]	158 [1.3]	337 [11]

## Annexe 21

Cartes de répartition des productions ovine et bovine en France<sup>5</sup>.



<sup>5</sup> Source : Service Central des Enquêtes et Etudes Statistiques, 2001.

## RESUME

La toxoplasmose est une anthroponose d'importance médicale et vétérinaire, due au protozoaire *Toxoplasma gondii*. Les oocystes, émis par les félins, ont un rôle central dans la transmission du parasite en contaminant les animaux d'élevage, les végétaux et l'eau consommés par l'homme.

Au cours de ce travail, nous avons développé deux approches pour préciser la circulation des oocystes dans l'environnement : (i) la détection des oocystes dans l'eau par une nouvelle méthode, la séparation immunomagnétique (IMS), et (ii) la recherche du parasite dans des réservoirs animaux soumis à une infection par les oocystes (animaux d'élevage et sauvages).

Pour l'IMS, nous avons produit et caractérisé deux nouveaux anticorps monoclonaux (AcM 3G4 et 4B6) dirigés contre la paroi des oocystes. 3G4 reconnaît des antigènes de 58 et 67-69 kDa, et 4B6 un antigène >116 kDa spécifique de l'oocyste sporulé. Ces deux AcM ont une réactivité croisée avec d'autres coccidies autofluorescentes et phylogénétiquement proches de *T. gondii*. Ils ont été intégrés dans une IMS expérimentale, mais seul 4B6, plus spécifique que 3G4, a été retenu pour une application en conditions naturelles.

Cinquante prélèvements d'eaux de surface, prélevés dans des contextes épidémiologiques particuliers, ont été analysés par filtration, IMS-4B6, IFI, bioessai et PCR en temps réel. Aucun toxoplasme n'a été mis en évidence avec certitude. Parallèlement, l'analyse de 639 sérums d'animaux d'élevage et sauvages montre, chez quatre espèces potentiellement soumises à une infection par les oocystes en Limousin, une séroprévalence de 20,6% à 59,1% chez les ovins, de 27,5% chez les bovins, de 18,5% chez le poulet de plein air et de 20,4% chez le ragondin. Des toxoplasmes, de génotype II, ont pu être isolés.

Ce travail contribue à préciser la séroprévalence de la toxoplasmose dans les réservoirs animaux et propose des améliorations techniques et stratégiques pour détecter les oocystes par IMS. Ces résultats préliminaires devront être poursuivis par des études épidémiologiques plus extensives.

**Mots-clés :** *Toxoplasma gondii*, toxoplasmose, oocyste, chat, eau, environnement, détection, anticorps monoclonaux, séparation immunomagnétique

## ABSTRACT

Toxoplasmosis is an anthroponosis of medical and veterinary importance, due to the protozoan *Toxoplasma gondii*. Oocysts shed by felids play a key role in parasite transmission as they contaminate meat-producing animals, vegetables and water consumed later by humans.

In this work, two approaches were developed to refine the oocyst prevalence in the environment (i) a new method to detect waterborne oocysts, the immunomagnetic separation (IMS), and (ii) a study of the toxoplasmosis prevalence in oocyst-infected animals (meat-producing and wild).

For IMS development, two new monoclonal antibodies (mAb 3G4 and 4B6) directed against the oocyst wall were produced and characterised. 3G4 reacts with 58 and 67-69 kDa antigens while 4B6 is specific of >116 kDa antigen of the sporulated oocyst. These two mAb cross-react with autofluorescent coccidia phylogenetically closed to *T. gondii*. Experimental IMSs were developed with these mAb, but only the more specific one, 4B6, was integrated for further IMS experiments in field conditions.

Fifty surface water samples, recovered in particular epidemiological contexts, were analysed by filtration, IMS-4B6, IFI, bioassay and real-time PCR. We failed to detect *Toxoplasma* in these samples. In the same time, the analysis of 639 serums of meat-producing and wild animals showed in four oocyst-infected species from Limousin region, seroprevalence of 20,6% to 59,1% in sheep, 27,5% in bovines, 18,5% in free-ranging chickens and 20,4% in nutria. Some genotype II *Toxoplasma* isolates were isolated.

This work contributes to precise the toxoplasmosis prevalence in animal reservoirs, and proposes technical and strategic improvements to detect oocysts by IMS. These first results need to be followed by more extensive investigations.

**Keywords** : *Toxoplasma gondii*, toxoplasmosis, oocyst, cat, water, environment, detection, monoclonal antibody, immunomagnetic separation