

## La réponse immunitaire induite par *Neospora caninum*

GHALMI F.

Laboratoire de Parasitologie-Mycologie. École Nationale Supérieure Vétérinaire d'Alger, BP 161, El-Harrach, Alger, Algérie  
Correspondance : Email : fghalmi@yahoo.fr

**RÉSUMÉ** : *Neospora caninum* est un protozoaire intracellulaire de la classe des *Apicomplexa*, essentiellement responsable d'avortements chez les bovins et d'une pathologie neuro-musculaire chez l'espèce canine. Il s'agit d'un parasite à cycle hétéroxène qui peut se montrer invasif et atteindre les organes profonds de l'hôte intermédiaire comme le cerveau, les poumons, le foie ou la rate. La réponse immunitaire de l'hôte vis-à-vis de ce pathogène a été étudiée principalement chez la souris et le bovin. Cet article présente les principaux travaux réalisés sur ces modèles ainsi que les essais vaccinaux entrepris. On constate que même si la réponse immunitaire spécifique de type humorale (anticorps spécifiques) est intense, c'est la réponse immunitaire de type cellulaire médiée principalement par l'interféron gamma (IFN- $\gamma$ ) qui est la clé de la résistance à l'infection. Cette cytokine est produite par les lymphocytes Th1 et tend à inhiber la réponse Th2. Si la protection est efficace chez les animaux non gestants qui restent pour la plupart asymptomatiques, la situation est plus critique pour les animaux gestants. En effet, on constate dans ce cas que la réponse Th1 tend à laisser la place à la réponse Th2 pour garantir le maintien du fœtus. Ceci s'accompagne d'une transmission verticale de *N. caninum* pouvant entraîner l'avortement dans un certain nombre de cas. Le système immunitaire du fœtus peut prendre le relais si l'infection a lieu après 4 mois de gestation avec naissance de veaux viables mais séropositifs. La vaccination qui a été modélisée chez la souris et qui a donné lieu au développement d'un vaccin commercial chez le bovin permet de réduire les signes cliniques et les avortements chez l'hôte mais pas de façon systématique. La compréhension de l'interaction hôte-parasite devrait nous permettre de mieux envisager la lutte prophylactique contre ce pathogène.

### 1. INTRODUCTION

*Neospora caninum* est un protozoaire Apicomplexa proche de *Toxoplasma gondii*. Il a émergé comme une cause majeure d'avortement chez la vache partout dans le monde (Dubey et Lindsay, 1996). Les vaches infectées ont 2 à 7 fois plus de risque d'avorter comparées aux animaux non-infectés (Pare *et al.*, 1997 ; Thurmond et Hietala, 1997 ; Moen *et al.*, 1998 ; Waldner *et al.*, 1998 ; Davison *et al.*, 1999a ; Jensen *et al.*, 1999 ; Lopez-Gatius *et al.*, 2004 ; Romero *et al.*, 2005). *N. caninum* utilise le chien et le coyote comme hôtes définitifs (McAllister *et al.*, 1998 ; Gondim *et al.*, 2004). Les chiens éliminent de façon transitoire les oocystes de *N. caninum* après ingestion de tissus d'hôtes intermédiaires (de nombreuses espèces animales notamment le bovin) infectés par le parasite (Basso *et al.*, 2001 ; Dijkstra *et al.*, 2001 ; Schares *et al.*, 2001 ; Gondim *et al.*, 2002). Chez l'hôte intermédiaire, le parasite

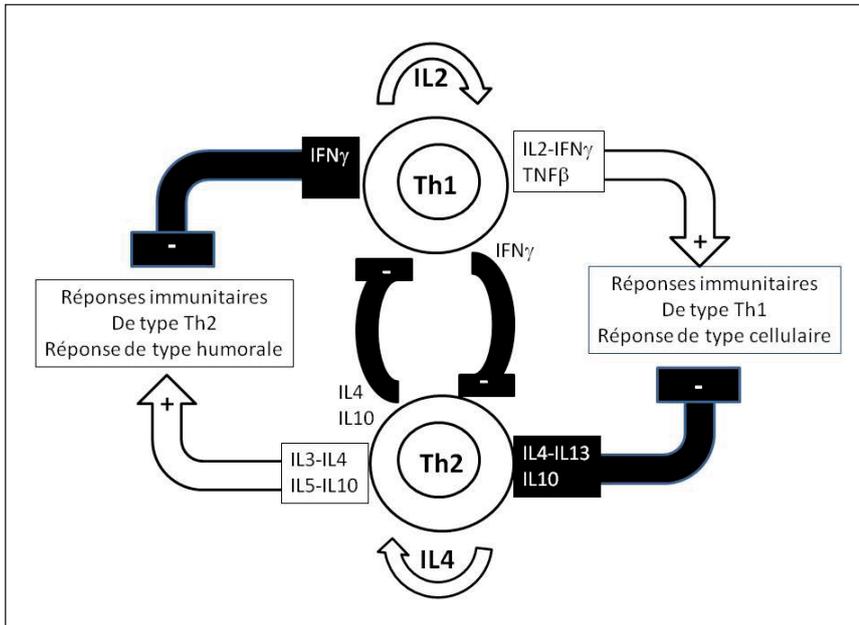
se transforme en tachyzoïte qui se multiplie par endodyogenie dans de nombreux types de cellules : cellules nerveuses, macrophages, fibroblastes, cellules endothéliales vasculaires, myocytes, cellules rénales tubulaires et hépatocytes (Dubey *et al.*, 1988 ; Speer et Dubey, 1989). Les tachy-zoïtes peuvent alors se différencier en une forme se répliquant plus lentement : le bradyzoïte qui s'enkyste dans les tissus. Cette transformation est très probablement initiée en réponse à la réaction immunitaire de l'hôte. Les kystes tissulaires à brady-zoïtes peuvent d'ailleurs persister très longtemps dans les tissus (Lindsay *et al.*, 1992) et constituent le réservoir pour l'infection du fœtus ou de l'hôte définitif (Gondim *et al.*, 2002).

*N. caninum* peut être transmis au bétail via la nourriture ou l'eau contaminées par les excréments du chien (McAllister *et al.*, 2000 ; Dijkstra *et al.*, 2002). Bien que la transmission horizontale semble

jouer un rôle vital dans la survie du parasite, la transmission transplacentaire de *N. caninum* demeure la voie majeure de contamination chez la vache et les veaux infectés congénitalement restent porteurs du parasite à vie et peuvent passer l'infection de nouveau à leur descendance (Björkman *et al.*, 1996 ; Paré *et al.*, 1996 ; Anderson *et al.*, 1997 ; Wouda *et al.*, 1998 ; Schares *et al.*, 1998 ; Davison *et al.*, 1999b). En outre, les transmissions transplacentaires peuvent se répéter chez un même animal (Barr *et al.*, 1993).

Les conséquences de l'infection chez la vache gestante vont dépendre de l'âge du fœtus au moment de l'infection et du statut immunitaire de la vache (Innes *et al.*, 2002). Cela peut aller de l'avortement, à la naissance d'un veau malformé, ou d'un veau normal mais infecté chroniquement par le parasite (Dubey et Lindsay, 1996).

**Figure 1. La réponse immunitaire spécifique :** les réponses de type Th1 et Th2 ont tendance à s'exclure mutuellement. Les lymphocytes Th1 produisent de l'IFN $\gamma$  qui inhibe les lymphocytes Th2 alors que les lymphocytes Th2 produisent de l'IL-4 et de l'IL-10 qui inhibent la réponse Th1. Les lymphocytes Th1 s'autostimulent en produisant de l'IL-2 et entraînent une réponse de type cellulaire en produisant du TNF- $\beta$  et de l'IFN- $\gamma$  alors que l'IL-4 autostimule les Th2 et permet avec l'IL-3, l'IL-5 et l'IL-10 la production d'une réponse de type humorale.



Chez le chien, *N. caninum* est responsable d'une maladie neuromusculaire. Les cas les plus sévères ont été décrits chez des chiots congénitalement infectés présentant de la paralysie et de l'atrophie musculaire (Barber et Trees, 1996 ; Dubey et Lindsay, 1996).

Par ailleurs, d'autres espèces y compris l'homme peuvent développer des anticorps contre *N. caninum* comme le montrent de nombreuses études sérologiques (Tranas *et al.*, 1999; Dubey *et al.*, 2007 ; Ghalmi *et al.*, 2007). Enfin, différents animaux se sont révélés sensibles à une infection expérimentale par *N. caninum* (Rettigner *et al.*, 2004).

*N. caninum* est un parasite intracellulaire obligatoire. Il en résulte une participation importante de l'immunité à médiation cellulaire pour contrôler le développement du parasite chez l'hôte (Hemphill, 1999).

Dans cet article, nous passerons en revue les connaissances actuelles de la réponse immunitaire développée face à une infection à *N. caninum* chez les ruminants et les modèles murins.

## 2. LA RÉPONSE IMMUNITAIRE

Les cellules, qui produisent des cytokines, jouant un rôle central dans la régulation et l'orientation de la réponse immunitaire sont les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> ou T auxiliaires (T helper ou Th). À partir d'une population cellulaire indifférenciée appelée Th0, ils se différencient en deux sous-populations lymphocytaires appelées Th1 et Th2. Parmi les différentes classes de lymphocytes T, ce sont des lymphocytes importants dans la régulation de la réponse immunitaire. Les lymphocytes Th1 produisent surtout les interleukines IL-2, l'interféron gamma (IFN- $\gamma$ ) et les Tumor Necrosis Factor (TNF $\alpha$  et  $\beta$ ) alors que les lymphocytes Th2 produisent de l'IL-4, de l'IL-5, de l'IL-6, de l'IL-10 et de l'IL-13. L'orientation vers la voie Th1 dépend essentiellement de l'IFN- $\gamma$  et de l'IL-12 alors que l'orientation vers la voie Th2 dépend de l'IL-4 (Wilczynski, 2006) (Figure 1).

La voie Th1 conduit essentiellement à une réponse immunitaire de

type cellulaire avec activation des macrophages et des lymphocytes T cytotoxiques ainsi qu'à la production d'anticorps de l'isotype IgG2a chez la souris, alors que la voie Th2 conduit essentiellement à une réponse immunitaire de type humorale avec production d'anticorps spécifiques principalement de l'isotype IgG1 (aussi chez la souris). Ces deux types de réponses s'excluent mutuellement, les cytokines Th1 inhibent la réponse Th2 et vice versa.

En général, au cours de l'infection par un pathogène intracellulaire, l'IL-12, sécrétée par les cellules présentatrices d'antigène, stimule la différenciation Th1 des lymphocytes T et la production d'IFN- $\gamma$  par les cellules Th1 et par les cellules NK (Natural Killers). Elle stimule également sa propre production. L'IFN- $\gamma$  active les fonctions microbicides des macrophages et leur production de NO, O<sub>2</sub><sup>-</sup> et ROI (intermédiaires réactifs de l'oxygène) ainsi que l'activité cytotoxique des lymphocytes CD8<sup>+</sup> et des cellules NK. Les cellules CD8<sup>+</sup> sécrètent l'IFN- $\gamma$  et le TNF- $\alpha$ , la perforine et les granzymes et induisent la mort de la cellule cible. La production d'anticorps opsonisants accroît encore l'élimination du pathogène par les cellules microbicides (Rettigner, 2004).

## 3. LE MODÈLE MURIN

Différentes souches de souris ont été utilisées pour tenter d'accumuler un maximum de connaissances sur l'immunité développée contre *N. caninum* (Anderson *et al.*, 2000 ; Hemphill *et al.*, 2000). La souris est expérimentalement sensible à *N. caninum* quoique des différences de sensibilité existent selon les lignées (Dubey, 2003). Chez la souris BALB/c, *N. caninum* cause des avortements (Long et Baszler, 1996), chez la souris Swiss white, une infection expérimentale à *N. caninum* induit des signes cliniques comme la pneumonie, la myosite et l'encéphalite (Lindsay et Dubey, 1989). En revanche, les souris A/J sont résistantes à l'infection (Khan *et al.*, 1997). Différentes études ont été menées chez cet animal de laboratoire afin

d'investiguer la réponse immunitaire vis-à-vis de *N. caninum*.

La plupart des animaux non gestants peuvent faire face à l'infection par *N. caninum* et ne présenter aucun signe clinique, alors que le parasite persiste bien dans l'organisme. Il serait donc intéressant d'observer chez les animaux cliniquement sains comment la réponse immunitaire contrôle le parasite (Hemphill *et al.*, 2000).

### 3.1. Chez la souris non gestante

D'emblée, il a été constaté que pour lutter contre un parasite intracellulaire, la réponse immunitaire de type Th1 semble plus efficace. Pour confirmer cette hypothèse Baszler *et al.* (1999) ont établi le protocole suivant : un groupe de souris a été inoculé avec *N. caninum* et un anticorps anti-IFN- $\gamma$ , un groupe avec *N. caninum* et de l'IL-12 et un groupe avec *N. caninum* et à la fois un anti-IFN- $\gamma$  et l'IL-12. Il ressort (i) que la neutralisation de l'IFN- $\gamma$  entraîne une augmentation de la mortalité et de la morbidité durant une infection aiguë à *N. caninum* (ii) l'IL-12 entraîne une diminution de la sévérité des signes cliniques précoces mais ne semble pas altérer la progression de la maladie à long terme, (iii) l'effet transitoire de l'IL-12 est dû à l'IFN- $\gamma$ . Par conséquent l'IFN- $\gamma$  (la principale cytokine Th1) est le médiateur majeur de la survie et de la résistance à la maladie pendant une infection aiguë à *N. caninum* (Khan *et al.*, 1997; Long *et al.*, 1998 ; McAllister *et al.*, 1998).

Les souris BALB/c sont résistantes à une infection aiguë à *N. caninum* mais développent une infection chronique alors que les souris déficientes en IFN- $\gamma$  étaient sensibles à l'infection aiguë avec la mort survenant dans les 9 jours post-inoculation et que les animaux traités avec de l'IFN- $\gamma$  survivaient plus longtemps. Les souris déficientes en IFN- $\gamma$  n'ont pas une expression augmentée des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe 2 au niveau des macrophages. De plus, elles ne stimulent pas la prolifération des lymphocytes T contrairement aux souris sauvages. Cette étude souligne l'importance de l'IFN- $\gamma$  pour activer les macrophages et induire une réponse immunitaire

protectrice (Nishikawa *et al.*, 2001b). Dans l'infection aiguë à *N. caninum*, les souris BALB/c-déficientes dans la production d'IFN- $\gamma$  et sensibles à l'infection par *N. caninum*, montrent des niveaux élevés de production d'IL-10. Par contre, des niveaux élevés d'IFN- $\gamma$  et d'IL-4 sont produits par les souris du type sauvage infectées mais résistantes à l'infection (Nishikawa *et al.*, 2003). Par conséquent, la balance IFN- $\gamma$ /IL-4 peut avoir un rôle important dans la réponse à médiation cellulaire dirigée contre le parasite.

Un autre rôle de l'IFN- $\gamma$  serait d'induire l'apoptose de cellules infectées par *N. caninum* comme montré sur des fibroblastes murins en culture (Nishikawa *et al.*, 2002).

Cependant, la réponse humorale et les lymphocytes B ne sont pas à négliger. Ainsi, Eperon *et coll.* (1999) ont infecté des souris sauvages C57BL/6 et leur mutant  $\mu$ MT (déficient en cellules B) par *N. caninum*. Ils ont constaté que les souris sauvages ne montraient pas de signes cliniques de néosporose alors que les souris mutantes mouraient de l'infection à partir du 29<sup>ème</sup> jour post-inoculation. Le parasite est retrouvé dans le cerveau de toutes les souris sauvages 44 jours après l'inoculation et 24 jours après l'inoculation pour les mutantes. Les souris  $\mu$ MT montraient des lésions nécrotiques au niveau du cerveau avec de nombreux tachyzoïtes alors que le nombre de tachyzoïtes détectés au niveau du cerveau des souris sauvages était faible. La mort est probablement due à ces nécroses cérébrales. Au niveau du sérum, les souris sauvages présentaient des anticorps anti-*N. caninum* d'isotypes IgG2a, IgG2b et dans une moindre mesure IgG3 alors que les IgG1 étaient absents. Ceci est à mettre en relation avec le fait que la présence de l'IFN- $\gamma$  et l'absence d'IL-4 conduisent préférentiellement à la production d'IgG2a et d'IgG3 alors que la conversion en IgG1 et IgE est inhibée (Snapper et Finkelman, 1993).

La stimulation *in vitro* de splénocytes avec des antigènes de *N. caninum* ou avec la concanavale A (un mitogène T et mitogène B T-dépendant = conA) a entraîné une réponse lymphoproliférative dans les deux cas, aussi bien chez les souris sauvages que mutantes ( $\mu$ MT) infectées avec *N. caninum*. Alors

que 10 jours après l'infection, les souris sauvages et mutantes infectées montraient clairement une réponse immunodéprimée à la stimulation à la Con A, à 24 jours après l'inoculation, cette immunosuppression est maintenue chez les souris  $\mu$ MT mais disparaît chez les souris sauvages (Eperon *et al.*, 1999). Une prolifération lymphocytaire réduite a aussi été observée après la stimulation par les antigènes de *N. caninum* quand les souris infectées sont comparées avec des souris inoculées avec des parasites morts. Cette immunosuppression est liée à l'intensité de la stimulation antigénique. Les splénocytes des souris sauvages retrouvent leur capacité à proliférer normalement à la stimulation à la conA et aux antigènes de *N. caninum* alors que les souris  $\mu$ MT ne montrent pas de réponse proliférative. Cette suppression de la réponse immunitaire a été liée à la réduction de la production d'IL-2.

D'un autre côté, les macrophages activés sont connus pour produire de l'IL-10 qui inhibe la prolifération des lymphocytes T (Taga et Tosato, 1992). De fait, on constate une augmentation de l'IL-10 chez les souris sauvages dans les stades précoces de l'infection coïncidant avec la suppression de la réponse proliférative. De plus, l'infection induit spécifiquement et simultanément une augmentation de la production d'IFN- $\gamma$  et l'IL-10 par les splénocytes stimulés par des antigènes de *N. caninum*. Chez les souris mutées, la production d'IL-10 et dans une moindre mesure d'IFN- $\gamma$  est significativement diminuée dans les stades avancés de l'infection (Eperon *et al.*, 1999).

L'infection par des pathogènes intracellulaires entraîne la production d'IL-12, IFN- $\gamma$  et d'IL-10 (Trinchieri, 1997). Après l'infection, le pathogène intracellulaire provoque la production d'IL-12 par les phagocytes (Teixeira *et al.*, 2010). L'IL-12 stimule la production d'IFN- $\gamma$  par les cellules Th1 et les cellules NK. Ensuite, l'IFN- $\gamma$  active les macrophages qui vont produire davantage l'IL-12. Mais comme la production d'IL-12 entraîne une toxicité, elle stimule aussi la production de son inhibiteur, l'IL-10 produite par les lymphocytes et les cellules phagocytaires. En principe, un patho-

gène intracellulaire induit une réponse Th1 avec une production d'IFN- $\gamma$  et l'activation des macrophages. Mais dans ce cas-ci, on assiste à une production concomitante d'IFN- $\gamma$  (Th1) et d'IL-10 (Th2) s'opposant à une dichotomie claire Th1/Th2. De telles observations ont également été réalisées pour *Toxoplasma gondii* (Allen et Maizels, 1997) ou pour *Plasmodium falciparum* (Kossodo *et al.*, 1997). Ainsi, l'IL-10 est protectrice chez la souris contre une infection à *T. gondii* (Gazzinelli *et al.*, 1996). Par conséquent, les parasites peuvent induire la production de l'IL-10 non seulement pour inhiber la réponse cellulaire à leur bénéfice mais aussi au bénéfice de l'hôte. Ainsi, l'absence de réponse humorale n'est pas le seul facteur expliquant la mort des souris mutées. En effet, l'inhibition de la prolifération lymphocytaire et de la production d'IFN- $\gamma$  et d'IL-10 semble diminuer la protection contre la maladie.

À côté des lymphocytes T CD4+, on trouve les lymphocytes T CD8+ cytotoxiques qui interviennent dans la lyse de cellules parasitées. Des souris traitées avec des anticorps anti-CD4+ ou anti-CD8+ avant une infection par *N. caninum* meurent endéans les 30 jours dans le groupe traité par l'anticorps anti-CD4+, alors qu'aucune mortalité n'a été observée pendant cette période dans le groupe traité par l'anticorps monoclonal anti-CD8+ (Tanaka *et al.*, 2000). Dans une autre étude (Spencer *et al.*, 2005), un groupe de souris a reçu des lymphocytes CD8+ isolés de rates de souris immunisées par *N. caninum* et un groupe a reçu des lymphocytes CD4+ des mêmes souris. Les deux groupes de souris ont été infectés par *N. caninum*. Les souris ayant reçu les cellules CD8+ ont développé des signes neurologiques sévères, de l'ataxie, des troubles moteurs. Ces signes persistent durant l'étude (28j) mais sans s'aggraver et s'accompagnent d'une cachexie. Dans le groupe ayant reçu les cellules CD4+, les signes cliniques étaient plus légers avec une légère ataxie au jour 22 mais plus aucun signe clinique à la fin de l'expérience. Or, durant une infection aiguë, les cellules CD8+ sont censées agir comme cellules cytotoxiques limitant la dissémination du parasite soit en reconnaissant les cellules infectées et présentant les antigènes

parasitaires en combinaison avec les molécules de classe 1 du complexe majeur d'histocompatibilité soit en produisant des cytokines. Cette étude suggère qu'un excès de cellules CD8+ exacerbe la destruction des cellules et la production des cytokines conduisant à des manifestations neurologiques sévères tandis que l'étude de Tanaka et coll (2000) suggère que les lymphocytes T CD8+ ne jouent pas de rôle central dans le contrôle de l'infection.

Dans une autre étude, Rettigner et coll. (2004) ont montré que les souris CBA/Ca développaient une réponse spécifique à *N. caninum* avec une augmentation d'IFN- $\gamma$  (Th1) mais aussi d'IL-4 (Th2) et d'IL-10 (Th2) quoi que moins importante. Aucune lésion tissulaire n'a pu être mise en évidence. Cependant, des kystes se développent dans les tissus 10 semaines après l'infection avec des doses élevées de *N. caninum* (>10<sup>6</sup>). Il semble donc que l'IFN- $\gamma$  puisse protéger la souris même en présence de cytokine de type Th2.

L'IL-12 est produite par les cellules dendritiques très tôt après l'infection des souris par *N. caninum* qui s'accompagne d'une augmentation des protéines du CMH de classe 2 par ces cellules (Teixeira *et al.*, 2010).

L'étude menée par Khan et coll (1997) a montré la mise en place d'une réponse immunitaire de type Th1 lors de l'infection par *N. caninum*. Les taux d'ARN messager pour l'IL-12 et l'IFN- $\gamma$  augmentent de manière considérable (jusqu'à 200 fois) dans les heures qui suivent l'infection de souris A/J par des tachyzoïtes. Le taux d'ARNm de l'IL-12 revient rapidement à son taux de base alors que celui de l'IFN- $\gamma$  reste élevé (20 fois) pendant plusieurs jours. Un taux élevé d'ARNm de l'IL-10 a, quant à lui, été détecté entre les jours 10 et 21 après infection. Ces animaux ont développé une réponse lymphoproliférativespécifiquemesurable à partir du 10<sup>ème</sup> jour de l'infection alors que la production d'IFN- $\gamma$  par les splénocytes maintenus en cultures est présente dès le jour 3 post-infection.

L'importance de la production des cytokines de type Th1 dans la résistance à l'infection est confirmée par Long *et al.* (1998) qui observent que les souris présentant un rapport IFN- $\gamma$ /IL-4

élevé se montrent résistantes vis-à-vis de l'infection alors que les souris chez qui ce rapport est plus faible expérimentent des lésions cérébrales plus importantes ainsi qu'une charge parasitaire plus élevée. Chez ces animaux, le contrôle de l'infection est également associé à la production préférentielle d'IgG2a. D'autre part, la mise en place d'une réponse immune de type Th2 chez les souris BALB/c recevant une suspension de tachyzoïtes tués s'accompagne d'une aggravation des lésions d'encéphalite chez les souris immunisées par rapport aux souris contrôles (Baszler *et al.*, 2000 ; Rettigner, 2004).

Cette importance de l'IFN- $\gamma$  dans la résistance à l'infection est mise en évidence par l'utilisation de lignées murines génétiquement déficientes en IFN- $\gamma$  ou ayant reçu une dose inhibitrice d'anticorps anti-IFN- $\gamma$ . Ces souris se montrent très sensibles à l'infection et succombent généralement au cours des dix premiers jours de l'infection (Khan *et al.*, 1997 ; Tanaka *et al.*, 2000 ; Ritter *et al.*, 2002). La mortalité enregistrée au cours de la phase aiguë de l'infection est associée à une altération de l'expression des récepteurs du CMH de classe 2 sur les macrophages et à l'absence de réponse lymphoproliférative spécifique (Nishikawa *et al.*, 2001c).

Plusieurs autres facteurs participent également à la mise en place de la résistance vis-à-vis de l'infection par *N. caninum*. La cytokine TNF- $\alpha$  et le système de reconnaissance du CMH de classe 1 interviennent également dans la résistance. En effet, les souris génétiquement déficientes pour le récepteur 2 du TNF- $\alpha$  ou pour la  $\beta$ 2-microglobuline se montrent plus susceptibles à l'infection que les souches sauvages (Ritter *et al.*, 2002). Par contre, l'absence d'IL-10 et de l'enzyme iNOS, qui pourraient jouer un rôle dans la courte phase d'immunodépression observée 7 à 10 jours après l'inoculation de tachyzoïtes de *N. caninum*, n'accroît pas la résistance des animaux.

Étant donné que la néosporose apparaît principalement chez les animaux gestants, il est important de relever les changements qui ont lieu dans le système immunitaire au cours de la gestation et qui peuvent rendre l'animal vulnérable à la maladie.

### 3.2. La souris gestante

Il a été montré que la réponse de type 1 joue un rôle important dans la protection contre les parasites intra-cellulaires. L'inhibition des réponses Th1 lors de la gestation peut mener à une augmentation de la transmission verticale (Williams *et al.*, 2000).

Dans le modèle murin, Long et Baszler (2000) ont émis l'hypothèse que l'induction chez la mère de la réponse de type 1 pourrait empêcher la transmission verticale et ont démontré que la modulation des cytokines de type 2, en administrant un anticorps anti-IL-4 avant la gestation, pouvait réduire la fréquence de la transmission verticale de *N. caninum*. De plus, Long et Baszler (2000) ont montré que la neutralisation de l'IL-4 au moment de la primo-infection de souris CBA/Ca réduit de manière importante le taux d'infection fœtale après une inoculation d'épreuve administrée au cours de la gestation. Cette diminution du taux de transmission verticale était accompagnée d'une augmentation de la production d'IFN- $\gamma$  et d'une diminution de l'IL-4.

Une grande fréquence de transmission verticale est observée chez la souris BALB/c infectée par *N. caninum* quand les souris sont inoculées durant la gestation et ensuite réaccouplées dans les stades avancés de l'infection (Omata *et al.*, 2004). La transmission transplacentaire pourrait être due à la réactivation du parasite consécutive à l'inhibition de l'immunité protectrice de la souris.

Kano et collaborateurs en 2005 ont étudié la réponse immunitaire de type 1 et de type 2 suite à l'infection de la souris gestante ou non gestante par *N. caninum*. Quatre groupes de souris BALB/c ont été constitués. Le groupe 1p sont des souris gestantes inoculées avec *N. caninum* en début de gestation. Le groupe 1np qui sont des souris non gestantes inoculées avec de la même manière que les souris du groupe 1p. Le groupe 2 sont des souris infectées chroniquement par *N. caninum* et qui ont été croisées au moins 4 semaines après l'infection et le groupe 3 qui sont des souris gestantes infectées et qui ont été croisées au moins 4 semaines après la mise bas. Différents paramètres ont été examinés dans les différents groupes. Le

pourcentage de transmission verticale était de 27, 41 et 50% dans les groupes 1p, 2 et 3, respectivement.

Le taux d'IFN- $\gamma$  sérique augmente directement après l'inoculation dans les groupes 1p et 1np alors qu'aucune augmentation n'a été observée dans les groupes 2 et 3 durant la gestation ou après la mise bas. Si les souris des groupes 2 et 3 sont réinoculées (40 jours après la première) avec *N. caninum*, on observe la même augmentation transitoire d'IFN- $\gamma$  juste après l'inoculation. Les niveaux d'IL-4 sériques augmentent de la même façon après l'inoculation dans les groupes 1p et 1np. Après réinoculation, l'IL-4 augmente plus dans le sérum des souris du groupe 3 que dans celles du groupe 2. On observe aussi une augmentation des anticorps sériques IgG1 chez les souris du groupe 3 et ce, 5 jours après la réinoculation. Dans cette étude, on n'observe pas de différence dans la réponse de type 1 (IFN- $\gamma$ ) entre les souris gestantes et non gestantes. Ceci confirme les résultats déjà obtenus préalablement sur des souris JPA-1 (Shibahara *et al.*, 1999). Par contre, des études similaires menées avec le parasite *Toxoplasma gondii* proche de *N. caninum* où on a des taux augmentés d'IFN- $\gamma$  chez la souris gestante alors que la réponse de type 2 est faible (Thouvenin *et al.*, 1997).

Ceci peut être mis en relation avec le plus faible degré de pathogénicité de *N. caninum* pour la souris. De plus, la transmission verticale est observée dans les groupes 2 et 3 qui ne présentent pas d'augmentation d'IFN- $\gamma$ . Ce qui suggère que la transmission verticale dans la phase chronique de l'infection n'est pas accompagnée de production d'IFN- $\gamma$ . Ce qui peut s'expliquer soit par un faible taux de multiplication du parasite dans les tissus maternels, à une inhibition de la réponse Th1 ou une stimulation de la réponse Th2. Le niveau d'IL-4 sérique augmente de manière similaire après l'inoculation dans les groupes 1p et 1np. Dans le groupe 3, on observe des taux d'IL-4 sérique parfois supérieurs à ceux du groupe 2 après la seconde inoculation. Les titres en IgG1 anti-*N. caninum* augmentent dans le groupe 3, 10 jours après la réinfection. Donc, c'est la réponse Th2 qui est stimulée dans le groupe 3. Ces résultats suggèrent que les souris infectées

durant la gestation peuvent acquérir une réponse immunitaire plus faible vis-à-vis du parasite par comparaison aux souris infectées non gestantes et que les souris infectées durant la gestation peuvent montrer une réponse immunitaire de type 2 augmentée en cas d'infection secondaire.

Quinn et collaborateurs (2004) ont montré que les splénocytes de souris infectées mais non gestantes et infectées gestantes produisaient de l'IFN- $\gamma$ , de l'IL-12 et du TNF- $\alpha$ . Cependant, le taux de ces cytokines de type 1 était moins élevé chez les souris gestantes. Les deux groupes de souris produisent aussi de l'IL-10. L'IL-4 quant à elle n'est produite que chez les souris gestantes et serait responsable de la diminution de la production des cytokines de type 1. Les cytokines de type Th2 assurent la viabilité de la gestation (Wegmann *et al.*, 1993 ; Chaouat *et al.*, 1995). D'autre part, la production d'IL-10 est aussi observée chez des souris non gestantes infectées par *N. caninum* (Eperon *et al.*, 1999). Il n'y a donc pas de clivage clair entre la réponse Th1 et Th2 lors d'une infection chez la souris par *N. caninum*. La production d'IL-10 doit être vue comme un mécanisme pour réguler la production de niveaux toxiques de cytokines inflammatoires. Les souris des deux groupes produisent des IgG2a spécifiques de *N. caninum* ce qui est une réponse de type Th1 puisque l'IL-4 induit en général la production d'IgG1. De fait, le taux d'IgG2 est plus faible chez les souris gestantes où les anticorps de type IgG1 dominant. Il semble donc que la réponse immunitaire de type 1 est plus propice à réduire la transmission verticale de *N. caninum* que la réponse de type 2.

### 3.3. Vaccination

La recherche d'un vaccin capable d'inhiber la mise en place de l'infection latente par *N. caninum* et/ou la transmission verticale du parasite est en plein développement. En effet, il a été observé chez la souris que l'inoculation d'un lysat de tachyzoïtes en combinaison avec l'adjuvant Immun-MAXR™ prévenait la transmission verticale du parasite après une inoculation d'épreuve effectuée 2 à 4 semaines plus tard (Liddell *et al.*, 1999).

Le pouvoir immunogène de nombreuses protéines recombinantes a été testé. Le vaccin recombinant (virus de la vaccine-NcSAG1 ou virus de la vaccine-NcSRS2) diminue la dissémination du parasite chez les souris infectées expérimentalement ; de plus avec le vaccin recombinant (virus de la vaccine-NcSRS2) la transmission verticale est inhibée (Nishikawa *et al.*, 2001a et b). L'immunisation de souris avec des protéines parasitaires associées à des ISCOMS réduit significativement les lésions d'encéphalite chez les animaux après infection (Lunden *et al.*, 2002). Un vaccin ADN constitué d'un plasmide contenant la séquence d'ADN complémentaire de la protéine NcSAG1 ou NcSRS2 inhibe la dissémination cérébrale du parasite lorsqu'il est associé à l'injection de la protéine recombinante correspondante ; l'utilisation des seules protéines recombinantes n'offre, par contre, aucune protection (Cannas *et al.*, 2003). La transmission verticale est diminuée chez les souris immunisées avec un plasmide codant pour les protéines NcGRA7 ou NcSHP33 (Liddell *et al.*, 2003).

Pour souligner la complexité de la réponse Th1/Th2 à *N. caninum*, signalons encore que des souris immunisées avec l'antigène de surface NcSRS2 produisent des anticorps de type IgG1. Ces souris infectées par *N. caninum* ont montré une diminution significative de la transmission verticale de *N. caninum* par rapport à des souris non immunisées. D'autre part, la réponse immunitaire à l'infection était surtout de type Th2 avec un rapport IL-4/IFN- $\gamma$  élevé mesuré au niveau des splénocytes stimulés. Quoi qu'il en soit, cette réponse de type Th2 permet une protection contre l'infection par *N. caninum* (Haldorson *et al.*, 2005).

Par contre, une tentative d'immunisation avec des antigènes solubles de *N. caninum* s'est révélée désastreuse avec une aggravation de la maladie (Baszler *et al.*, 2000). La réponse immunitaire était aussi de type 2 avec sécrétion d'IL-4 et production d'IgG1. Donc il semble bien que le succès de l'immunisation dépende plus du type d'antigène que de la réponse immunitaire suscitée.

Dans une autre expérience d'immunisation, Lunden et collaborateurs (2002)

ont comparé 4 groupes de souris (i) un groupe immunisé avec des *N. caninum* vivants associés à des ISCOMS, (ii) un groupe immunisé avec un lysat de *N. caninum* et du quilA qui est une substance proche de la saponine, (iii) un groupe immunisé avec un lysat de *N. caninum* dans du PBS et (iv) un groupe témoin qui a reçu du quilA. Après infection par *N. caninum*, il a été constaté que seul le groupe immunisé avec la préparation de *N. caninum* vivants montraient une protection contre l'infection à *N. caninum*. De plus, il semble qu'il existe une corrélation entre le taux élevé d'IFN- $\gamma$  produit et le niveau de protection. Les immunisations à base de lysats cellulaires conduisaient plutôt à une réponse de type Th2 donnant lieu à une réponse inflammatoire moins importante au niveau du cerveau de ces souris mais aussi une moins bonne protection contre les lésions occasionnées par *N. caninum*.

Les souris BALB /c vaccinées avec un virus vaccinia recombinant exprimant la protéine de surface NcSRS2 ont résisté à la dissémination du parasite dans l'organisme, de plus faibles taux d'IFN- $\gamma$  et de plus forts taux d'IL-4 sont produits par les animaux vaccinés en comparaison avec les animaux non vaccinés (Nishikawa *et al.*, 2003).

Les protéines recombinantes rNcGRA7 (protéine des granules denses) et rNcSAG4 (spécifique du stade bradyzoïte) ont été utilisées comme vaccin contre *N. caninum* chez la souris (Aguado-Martinez *et al.*, 2009). Aucune protection n'a pu être mise en évidence puisque dans les groupes de souris vaccinées et non vaccinées, les individus meurent. Cependant, la survie est augmentée dans les groupes vaccinés surtout avec rNcSAG4. Les souris inoculées avec NcSAG4 montrent une réduction des niveaux d'IgG spécifiques et de cytokines avec une balance équilibrée entre IFN- $\gamma$  et IL-10. Les souris vaccinées avec rNcGRA7 montrent des réponses immunitaires humorales et cellulaires exacerbées avec une hyperproduction d'IFN- $\gamma$ . La vaccination avec la combinaison des deux protéines réduit l'infection des poumons et du cerveau mais pas de façon significative.

Les antigènes des rhoptries sont impliqués dans l'invasion des cellules hôtes ainsi que dans la formation de la vacuole parasitophore et dans l'interaction hôte-parasite. La protéine recombinante NcROP2 de rhoptries a été produite et utilisée comme vaccin chez la souris (Debache *et al.*, 2008). *In vitro*, tant la protéine recombinante qu'un anticorps dirigé contre celle-ci empêchent l'entrée de *N. caninum* dans les cellules en culture. *In vivo*, un groupe de souris a reçu le vaccin adjuvanté et un groupe du PBS avec l'adjuvant. Le challenge par *N. caninum* a montré que les souris du groupe contrôle ont développé des signes cliniques et sont mortes alors que les souris vaccinées n'ont pas montré de signes cliniques. De façon intéressante, on constate que les animaux vaccinés avec comme adjuvant la saponine ont développé une réponse humorale de type IgG1 alors que les animaux vaccinés avec une préparation protéique adjuvée avec l'adjuvant incomplet de Freund ont développé une réponse de type IgG2a. Ceci montre que le type d'adjuvant peut orienter la réponse immunitaire vers une réponse Th1 (Freund) ou Th2 (Saponine).

D'autres adjuvants comme les liposomes ont été utilisés avec succès pour induire une réponse immunitaire Th1 contre *N. caninum* chez la souris en utilisant l'antigène NcAMA1 (Zhang *et al.*, 2010).

## 4. LE BOVIN

### 4.1. Le bovin non gestant

Comme chez le modèle murin, les bovins infectés expérimentalement ou naturellement par *N. caninum* développent rapidement une réponse immune à médiation cellulaire accompagnée de la production d'IFN- $\gamma$  (Anderson *et al.*, 2000).

La mise en place de la réponse immune est rapide. Une réponse lymphoproliférative, déjà mesurable 4 à 6 jours après l'infection, s'accompagne de la production de taux élevés d'IFN- $\gamma$  (Lunden *et al.*, 1998). Cette réponse cellulaire se maintient durant une longue période (Guy *et al.*, 2001 ; Williams *et al.*, 2003). On observe l'activation de cellules à activité cytotolytique qui sont composées essentiellement de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (Staska *et al.*, 2003).

Chez le bovin, la dichotomie Th1/Th2 est un peu différente par rapport à la souris. En effet, suite à une infection parasitaire, la plupart des lymphocytes T auxiliaires produisent à la fois de l'IFN- $\gamma$  et de l'IL-4 en association avec une expression variable d'IL-2 et d'IL-10. De plus, chez le bovin, l'IL-10 n'est pas une cytokine de type 2 comme chez la souris mais elle est exprimée par les différents types de cellules T auxiliaires (Brown *et al.*, 1999).

Les premières preuves de l'importance de la réponse à médiation cellulaire pour le contrôle de l'infection à *N. caninum* ont été de montrer que les des cellules traitées *in vitro* par l'IFN- $\gamma$  inhibaient la multiplication du parasite (Innes *et al.*, 1995). De même, L'INF- $\gamma$  et le TNF- $\gamma$  inhibent la multiplication des tachyzoïtes de *N. caninum* dans des cultures primaires des cerveaux bovins (Yamane *et al.*, 2000). Plusieurs auteurs ont démontré la production d'IFN- $\gamma$  chez des bovins naturellement ou expérimentalement infectés par *N. caninum* (Innes *et al.*, 2005). Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> dérivés de bovins infectés sont capables de tuer des cellules autologues infectées par *N. caninum* (Staska *et al.*, 2003). On voit donc que les cytokines pro-inflammatoires et la production d'une réponse de type Th1 est importante pour une réponse immunitaire de type protectrice chez le bovin (Innes *et al.*, 2005).

La réponse humorale à *N. caninum* chez le bovin est utilisée comme outil de diagnostic et d'épidémiologie. Peu de choses sont connues concernant l'efficacité de la protection de ces anticorps. Néanmoins, un rôle probable serait la prévention de l'infection des cellules de l'hôte par le stade tachyzoïte du parasite (Innes *et al.*, 2002). Ils sont dirigés contre la forme extracellulaire du parasite, c'est-à-dire les tachyzoïtes lors de la phase de la parasitémie (Hemphill *et al.*, 2000). Jusqu'à présent, les tachyzoïtes sont la seule source d'antigène utilisée en diagnostic. Plusieurs antigènes immunodominants ont été décrits (17, 29/30, 37 et 46 kDa) (Bjerkas *et al.*, 1994). Chez les bovins naturellement contaminés, des protéines d'un poids moléculaire de 25, 65 et 116 kDa sont

reconnues par des sérums de vaches qui ont subi un avortement à *N. caninum* et à partir des avortons (Baszler *et al.*, 1996). La reconnaissance de 3 des 4 antigènes immunodominants (17, 29/30, 37 et 46 kDa) par des sérums de vaches naturellement contaminées est considérée comme une confirmation de l'infection (Schaes *et al.*, 1998). Cependant, un profil commun des antigènes reconnus chez la vache et le fœtus n'a pas encore été établi. De façon intéressante, l'antigène de 17 kDa est plus fortement reconnu en cas d'avortement (Alvarez-Garcia *et al.*, 2002).

La production d'anticorps spécifiques est détectable une semaine après l'infection et les titres d'anticorps circulants restent élevés durant une longue période. L'avidité des anticorps spécifiques s'accroît dès la 2<sup>ème</sup> semaine après l'infection et ceci jusqu'à la 12<sup>ème</sup> semaine moment où les valeurs atteignent un plateau (Maley *et al.*, 2001).

Dans le cas de l'infection expérimentale par des oocystes, une réponse proliférative spécifique est détectable une semaine après l'infection tandis que la production d'IgG1 et IgG2 apparaît 2 à 4 semaines après l'infection (De Marez *et al.*, 1999).

#### 4.2. Bovin gestant

Chez le bovin, la pathologie principale due à *N. caninum* est l'avortement. Or, la gestation pose des questions intéressantes au niveau immunitaire puisque le fœtus constitue une greffe semi-allogénique (la moitié des gènes venant du père et la moitié de la mère) pour la mère mais sans rejet. Ceci pose bien sûr le problème de la reconnaissance du soi et du non soi. L'explication avancée est une modulation de la réponse immunitaire (Entrican, 2002). La réponse de type Th1 qui est bénéfique pour éliminer *N. caninum* peut au niveau de la barrière materno-fœtale devenir dangereuse pour le fœtus et causer sa mort (Innes *et al.*, 2002). L'environnement en cytokines du placenta favorise les cytokines de type Th2 comme l'IL-10, l'IL-4 et le TGF- $\beta$  dont le rôle est de contrecarrer les cytokines Th1 responsables de l'inflammation (Entrican, 2002). Mais ce faisant, le

contrôle de l'infection à *N. caninum* est plus difficile.

Le taux d'anticorps sériques varie au cours de la gestation (Pare *et al.*, 1997 ; Guy *et al.*, 2001). Or le titre en anticorps est un indicateur indirect de la stimulation antigénique. Ainsi, une augmentation du titre en anticorps peut signifier la multiplication de *N. caninum* chez l'hôte. Une augmentation du titre en anticorps observée en milieu de gestation est plus liée à un avortement qu'une augmentation en fin de gestation (Pare *et al.*, 1997 ; Guy *et al.*, 2001). Si on regarde la réponse cellulaire, on constate que celle-ci ainsi que la production d'IFN- $\gamma$  diminuent à la mi-gestation (Innes *et al.*, 2001). De plus, la progestérone dirige la réponse immunitaire vers une réponse de type 2 (Kalinski *et al.*, 1997). Par conséquent, la gestation est propice au développement de *N. caninum*.

Les ruminants ont une placentation syndesmochoriale qui ne permet pas le transfert d'anticorps de la mère au fœtus (Osburn, 1981). Le fœtus bovin est positif à un test de prolifération cellulaire induite par des antigènes de *N. caninum* autour du jour 80 de la gestation et la maturation du système immunitaire se déroule tout au long de celle-ci qui est d'une durée de neuf mois (Osburn *et al.*, 1982). Chez les bovins infectés par *N. caninum*, les cellules de la rate et du foie du fœtus sont capables de répondre à une stimulation mitogène au environ du jour 100 de la gestation mais ne sont pas capables de produire de réponse humorale ou cellulaire spécifiques il faut attendre 130 jours de gestation pour voir apparaître cette réponse spécifique (Innes *et al.*, 2005). Au fur et à mesure que la gestation progresse, la capacité du fœtus à développer une réponse immunitaire contre le parasite augmente.

Les femelles infectées au jour 110 de leur gestation montrent une diminution du taux de cellules CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> et IL-2R<sup>+</sup> circulantes à partir de la 2<sup>ème</sup> semaine post-inoculation, cette chute est plus marquée encore après 3 semaines tandis que le taux de cellules B est lui, accru. Par contre, le taux des cellules CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> et IL-2R<sup>+</sup> est supérieur au sein des ganglions mésentériques.

Chez ces animaux, seule la rate montre un accroissement de l'expression de l'ARNm pour les cytokines TNF- $\alpha$  et IL-12. Aucune modification du niveau d'expression des cytokines n'est observée à partir des lymphocytes circulants (Almeria *et al.*, 2003).

Une expérience a été menée par inoculation de *N. caninum* à des vaches gestantes de 110 jours (Almeria *et al.*, 2010). Après 3, 6 et 9 semaines les fœtus ont été analysés. Après 6 semaines, une mère avait un fœtus mort qui présentait des lésions et des tachyzoïtes ont été détectés à la fois au niveau du fœtus et du placenta. Le fœtus était séropositif et un haut niveau d'IFN- $\gamma$  a été détecté au niveau des fluides fœtaux. Dans tous les cas, la transmission transplacentaire a été observée. Ces expériences révèlent que la sévérité des lésions placentaires et la réponse IFN- $\gamma$  intense de certains fœtus destinées à limiter la parasitémie entraînent en fait leur mort (Almeria *et al.*, 2010).

À 130 jours de gestation, les cellules de la rate de fœtus infectés par *N. caninum* ont une transcription augmentée des gènes de l'IFN- $\gamma$ , du TNF- $\alpha$  et de l'IL-10 (Almeira *et al.*, 2003). À partir du jour 168, une prolifération antigène-spécifique et une production d'IFN- $\gamma$  ont été montrées à partir de ganglions lymphatiques chez le fœtus infecté. De façon intéressante, les réponses les plus intenses ont été observées au niveau du ganglion retropharyngé qui reçoit le drainage lymphatique du cerveau, l'organe le plus touché chez le fœtus (Bartley *et al.*, 2004). Les fœtus plus âgés (jour 219-231) montrent une réponse humorale et cellulaire spécifiques importantes (Andrianarivo *et al.*, 2001). Par conséquent, à partir de la mi-gestation, le fœtus commence à développer une réponse immunitaire spécifique contre *N. caninum* qui peut lui permettre de survivre.

La relation hôte-parasite chez le bovin infecté par *N. caninum* est une interaction dynamique et modulée entre la réponse immunitaire de la mère, celle du fœtus et le parasite. Ce dernier exploite l'immunomodulation naturelle de la gestation pour infecter le fœtus. Si celui-ci survit, il naît naturellement contaminé sans signes cliniques apparents. Mais le parasite

est présent chez le veau et pourra en cas de gestation de nouveau infecter le fœtus. Du point de vue du parasite, c'est un mode de transmission et de survie assez efficace. Cependant, un bovin non-immun infecté par *N. caninum* avant la gestation ne transmet pas le parasite à sa descendance (Innes *et al.*, 2001). De plus, ces animaux développent une immunité suffisante pour empêcher la transmission verticale même si l'animal est de nouveau infecté en milieu de gestation (Innes *et al.*, 2001). Il est donc possible d'induire une immunité protectrice chez des animaux non immuns permettant d'empêcher la transmission verticale.

Chez les vaches gestantes, le type de réponse immune mise en place lors de l'infection par *N. caninum* semble varier en fonction de la période de la gestation durant laquelle a lieu l'infection. En effet, selon une étude menée par Innes (2007), les vaches infectées à 70 jours de gestation développent principalement une réponse immune à médiation cellulaire alors que chez les vaches infectées en fin de gestation, on observe essentiellement la production d'anticorps spécifiques. Chez les vaches infectées et gestantes, une étude a mis en évidence une phase d'immunodépression à partir de la 18<sup>ème</sup> semaine de gestation (Innes *et al.*, 2001).

Néanmoins, les vaches infectées au cours de leur gestation développent une réponse lymphoproliférative spécifique dans les 2 à 4 semaines qui suivent l'infection et, tout comme chez les animaux non gestants, cette réponse s'accompagne de la production d'IFN- $\gamma$ . Ces animaux mettent également en place une réponse humorale qui est maximale 2 à 6 semaines après l'infection. La réponse de type 1 s'accompagne de la production d'IFN- $\gamma$  qui induit la production d'anticorps IgG2 alors que la réponse de type 2 s'accompagne de la production d'IL-4 qui induit la production d'IgG1. Le ratio IgG1/IgG2 décroît après l'inoculation du parasite (Andrianarivo *et al.*, 2001). Williams et coll (2000) ont, quant à eux, observé une production préférentielle de l'isotype IgG2.

Une seule étude a été menée afin de tenter d'identifier la période de la gestation durant laquelle était réactivée l'infection chronique chez les vaches infectées de manière naturelle (Guy *et al.*, 2001). Cette équipe a constaté une augmentation du titre des anticorps spécifiques au cours de la gestation, qui s'accompagne de la transmission verticale du parasite. Ils ont observé que cette augmentation était plus précoce chez les vaches ayant avorté que chez celles ayant donné naissance à un veau infecté de manière congénitale. Néanmoins, aucune précision supplémentaire n'a pu être apportée. Par contre, aucune modification du taux d'anticorps n'a été observée chez les mères infectées chroniques et ayant donné naissance à un veau séronégatif. Aucune modification de la réponse lymphoproliférative spécifique ou de la production d'IFN- $\gamma$  n'a été observée lors de la réactivation de l'infection chronique.

La mise en évidence d'une réponse immune chez le fœtus infecté dépend essentiellement de l'âge de celui-ci au moment de l'infection et du laps de temps écoulé entre l'infection et le prélèvement.

Les résultats obtenus au cours d'infections expérimentales montrent que le développement d'une réponse cellulaire spécifique est sujet à une grande variabilité individuelle. Les fœtus âgés de 222 à 232 jours et examinés 9 semaines après l'infection maternelle présentent tous une réponse humorale importante basée essentiellement sur la production d'IgG1 spécifiques. Par contre, un grand nombre de fœtus ne présentaient pas de réponse lymphoproliférative spécifique (Andrianarivo *et al.*, 2001). Les fœtus infectés au début du 2<sup>ème</sup> trimestre de la gestation montrent 3 semaines après l'infection un accroissement du nombre de cellules CD3<sup>+</sup> au sein de la rate, une élévation non significative des cellules CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> et IL2R<sup>+</sup> est également observée. Les cytokines IFN- $\gamma$ , IL-10 et TNF- $\alpha$  sont exprimées en grande quantité tandis que le taux d'IL-4 est, lui, diminué (Almeria *et al.*, 2003).

Il semble que la pathogénie de l'infection chez le fœtus tout comme le type de réponse immune mater-

mise en place soient liés au moment de la gestation où a lieu l'infection. La mortalité fœtale est en effet très élevée lorsque l'infection a lieu à 10 semaines de gestation alors que 20 semaines plus tard, seule la naissance de veaux séropositifs est observée (Williams *et al.*, 2000).

### 4.3. Vaccination

Les vaccins vivants sont plus aptes à produire une immunité à médiation cellulaire chez l'hôte. Une souche atténuée semble donc un bon candidat comme c'est le cas pour la toxoplasmose avec le Toxovax (Innes *et al.*, 2002). Les problèmes des vaccins vivants sont le coût de production élevé et la possibilité de réversion vers la virulence. Les vaccins tués sont considérés comme moins dangereux mais sont moins aptes à entraîner une réaction immunitaire de type cellulaire (Innes *et al.*, 2002).

Ainsi, un vaccin fait de tachyzoïtes tués et adjuvés s'est montré immunogénique mais n'a pas empêché la transmission verticale chez le bovin (Andrianarivo *et al.*, 1999 ; 2000). De même, le vaccin commercial à base de tachyzoïtes tués (Neoguard®, Intervet) a été évalué sur des vaches laitières au Costa Rica (Romero *et al.*, 2005). Les résultats indiquaient une diminution de moitié d'avortement dans le groupe vacciné (11%) par rapport au groupe contrôle (21%).

La solution, est peut-être d'utiliser un vaccin recombinant à base de peptides purifiés. Ainsi, des peptides issus de l'antigène de surface NcSRS2 semblent induire une réponse de type T cytotoxique et Th1 chez la vache Holstein (Staska *et al.*, 2005). Quoiqu'il en soit, le vaccin doit contenir des antigènes importants pour la survie du parasite. Ceux-ci incluent des antigènes de surface (NcSAG1, NcSRS2) et des antigènes des trois types d'organelles sécrétrices : les micronèmes, les rhoptries et les granules denses. Si on considère la complexité de la biologie de *N. caninum*, il est peu probable d'induire une réponse immunitaire protectrice avec un seul antigène (Innes *et al.*, 2002).

## 5. DISCUSSION

*N. caninum* est un parasite protozoaire reconnu comme l'un des plus importants agents infectieux à l'origine des avortements et des mortinatalités chez le bovin à travers le monde (Dubey et Lindsay, 1996). La néo-sporose dont il est responsable se manifeste principalement durant la gestation au moment où le développement fœtal est particulièrement vulnérable. Par ailleurs, des signes neurologiques avec hyperextension des membres postérieurs chez des veaux nouveau-nés congénitalement infectés ont été décrits (Dubey et Lindsay, 1996).

Cependant, les études de la réponse immunitaire développée face à une infection par *N. caninum* sont nécessaires pour comprendre les mécanismes de cette pathologie.

La réponse immunitaire de l'hôte vis-à-vis de ce pathogène a été étudiée principalement chez la souris et le bovin (Anderson *et al.*, 2000 ; Hemphill *et al.*, 2000).

La réponse immunitaire chez l'hôte définitif n'a pas fait l'objet d'études importantes jusqu'à ce jour. Les seules études existantes chez le chien sont celles qui étudient la séroprévalence et donc l'intensité de la réponse de type humorale (Ghalimi *et al.*, 2007).

L'immunité à médiation cellulaire est généralement la principale réponse immunitaire protectrice contre les infections causées par des parasites protozoaires intracellulaires (Anderson *et al.*, 2000).

La lutte contre *N. caninum* ne peut s'envisager que par l'étude de son interaction avec son hôte. Ceci passe notamment par l'étude de la réponse immunitaire de l'hôte vis-à-vis de ce parasite. Si on considère les deux bras armés de la réponse immunitaire spécifique que sont la réponse cellulaire et la réponse humorale, on constate que la meilleure protection contre ce parasite intracellulaire obligatoire est fournie par la réponse cellulaire bien qu'une réponse humorale importante soit présente chez l'hôte comme en témoigne sa séroconversion rapide.

Si on considère la réponse cellulaire, on sait que celle-ci dépend essen-

tiellement de la réponse de type Th1 dont les médiateurs principaux sont l'IFN- $\gamma$  et l'IL-12 (Wilczynski, 2006).

Lors d'une infection à *N. caninum* chez un animal non gestant, c'est en effet l'IFN- $\gamma$  qui est la cytokine la plus abondamment produite (Khan *et al.*, 1997 ; Long *et al.*, 1998). Elle est la clé pour lutter efficacement contre une infection à *N. caninum* en agissant notamment par stimulation de la production des molécules de classe 2 du CMH au niveau des cellules présentatrices d'antigènes et ceci en stimulant les macrophages qui augmentent leur pouvoir parasiticide, en entraînant la prolifération des lymphocytes T (Th1 et T cytotoxiques) et en favorisant l'apoptose des cellules infectées (Nishikawa *et al.*, 2002). Chez la souris, l'IL-12 joue aussi un rôle important dans la lutte contre *N. caninum* (Nishikawa *et al.*, 2001c).

Chez l'animal non gestant, la réponse humorale est aussi importante par l'intermédiaire de la production d'IL-4 (Eperon *et al.*, 1999). Néanmoins, l'importance de la production d'IL-4 dans le développement de la résistance vis-à-vis de l'infection par *N. caninum* a été envisagée récemment. En effet, les souris BALB/c vaccinées à l'aide d'un vaccin recombinant NcSRS2, résistantes vis-à-vis de l'infection, produisent un taux d'IL-4 plus élevé que les souris non vaccinées et sensibles ; ces dernières montrent également un taux supérieur d'IFN- $\gamma$ . L'IL-4 pourrait, dans ce cas, modérer les effets immunopathologiques de l'IFN- $\gamma$ . D'ailleurs, l'adjonction d'IFN- $\gamma$  à des cultures de cellules infectées par *N. caninum* accroît la mortalité cellulaire, effet inhibé par IL-4 (Nishikawa *et al.*, 2003).

Les souris déficientes en cellules B montrent une phase d'immunosuppression soutenue qui s'accompagne d'une dissémination excessive du parasite et d'une production réduite d'IFN- $\gamma$  alors que la production d'IL-12 et d'IL-10 est supérieure à la normale (Eperon *et al.*, 1999). La production d'anticorps spécifiques pourrait également jouer un rôle dans la résistance vis-à-vis du parasite, car des anticorps monoclonaux dirigés contre les protéines Nc-p43

et Nc-p36 sont capables de réduire significativement *in vitro* la capacité d'invasion cellulaire des tachyzoïtes (Nishikawa *et al.*, 2000). Il est clair que les anticorps peuvent inhiber l'infection des cellules de l'hôte par les tachyzoïtes qui connaissent un bref passage extracellulaire entre deux cellules à infecter (Innes *et al.*, 2002).

Chez l'animal gestant, l'IFN- $\gamma$  semble jouer un rôle important pour réduire la transmission verticale quoique le modèle souris ne semble pas montrer un rôle de l'IFN- $\gamma$  lors de l'infection à *N. caninum*. Cependant, sa production est moins intense et tend à diminuer au cours de la gestation au profit d'une réponse Th2. La réponse Th1 ayant tendance à entraîner le rejet du fœtus, la réponse Th2 est plus compatible avec la gestation même si elle combat moins efficacement la transmission verticale du parasite. Cependant, après 4 mois de gestation, le fœtus est immunocompétent et peut lui-même se défendre contre le parasite. Mais si cette réponse est de type Th1, elle peut aussi entraîner la mort du fœtus (Almeira *et al.*, 2010).

Au niveau de la vaccination, de nombreux essais ont été réalisés avec de nombreuses formulations. Chez la souris, les résultats sont variables selon le type de souris utilisé, le type d'antigène et le type d'adjuvant. Cependant, de nombreux essais montrent des effets protecteurs. Les préparations à base d'antigènes recombinants et purifiés sont les plus utilisées. Cependant, la souris n'est qu'un modèle plus ou moins proche de l'hôte définitif (chien) ou intermédiaire (bovin) de *N. caninum*. En conséquence, les résultats obtenus dans ce modèle animal doivent être confirmés sur les hôtes naturels. Chez la vache, un vaccin commercial (Neoguard, Intervet) existe et permet de réduire dans une certaine mesure les avortements chez la vache. Il s'agit d'un vaccin inactivé et adjuvée qui

est administré chez la vache durant le premier trimestre de gestation en deux doses. Les taux d'anticorps anti-*N. caninum* sont plus élevés chez les animaux vaccinés que chez les animaux non vaccinés et le taux d'avortement est significativement diminué dans certaines études même si la transmission verticale n'est pas complètement stoppée. La mise sur le marché américain a été autorisée par l'United States Department of Agriculture en 2002 (Frankena *et al.*, 2003 ; Heuer *et al.*, 2003 ; Romero *et al.*, 2004).

L'avantage de ce genre de vaccin est son faible coût de production. Son désavantage est son incapacité à induire une immunité de longue durée puisque les antigènes sont rapidement éliminés par l'hôte. Il faut donc que le contact avec le système immunitaire soit suffisant pour induire une mémoire immunologique suffisante afin de pouvoir être réactivée lors d'une infection par *N. caninum*. De façon surprenante, on ne trouve pas de telles données dans la littérature.

## 6. REMERCIEMENTS

F. Ghami remercie le Dr Bernard China pour sa lecture critique du manuscrit et ses conseils avisés.

F. Ghami remercie tous ceux qui ont stimulé ses recherches de leurs encouragements constants (Pr L. Guezlane, Pr B. Losson, Dr N. Azzag, Dr S. Tennah, Dr S. Y. Derdour, Dr F. Hafsi, Dr R. Bouabdallah et Dr A. Laamari).

## SUMMARY

*Neospora caninum* is an Apicomplexan heteroxenous parasite with dog as domestic definitive host and bovine as intermediate host. This parasite is responsible for many abortions in bovine worldwide. It is an obligate intra-

cellular parasite which is invasive since it can reach deep host organs such as brain, lungs, liver or spleen. The host immune response against this pathogen was essentially studied in mouse and bovine. This article presents the most relevant studies performed on these models and the vaccine trials tested. It appears that although the humoral specific immune response (specific antibodies) is intense with seropositive hosts, the cellular immune response mediated mainly by gamma interferon (IFN- $\gamma$ ) is the key of the control to infection by *N. caninum*.

This cytokine is produced by Th1 lymphocytes and inhibits the Th2 response. If the protection is efficient in non-pregnant animals remaining mostly asymptomatic, the situation is more critical in pregnant animals. Indeed, in this case Th1 response is reduced by Th2 response to guaranty the maintain of the fetus. It can conduct to a vertical transmission of *N. caninum* leading in many cases to abortion. The fetal immune system is efficient after 4 months of pregnancy and can act against the parasite leading to viable but seropositive calves.

Vaccination can be modelised in mouse and lead to the development of a commercially available vaccine in bovine allowing a reduction of clinical signs and abortions in host but not systematically. The understanding of the host-parasite interaction should allow to more accurately act in a prophylactic way to this pathogen.

## BIBLIOGRAPHIE

- AGUADO-MARTINEZ A., ALVAREZ-GARCIAG., FERNANDEZ-GARCIA A., RISCO-CASTILLO V., MARUGAN-HERNANDEZ V., ORTEGA-MORA L. M. Failure of a vaccine using immunogenic recombinant proteins rNcSAG4 and rNcGRA7 against neosporosis in mice. *Vaccine*. 2009, **27**, 7331-8.
- ALLEN J. E., MAIZELS R. M. Th1-Th2: reliable paradigm or dangerous dogma. *Immunol. Today*. 1997, **18**, 387-92.
- ALMERIA S., DE MAREZ T., DAWSON H., ARAUJO R., DUBEY J. P., GASBARRE L. C. Cytokine gene expression in dams and foetuses after experimental *Neospora caninum* infection of heifers at 110 days of gestation. *Parasite Immunol.*, 2003, **25**, 383-92.
- ALMERIA S., ARAUJO R., TUO W., LOPEZ-GATIUS F., DUBEY J. P., GASBARRE L. C. Fetal death in cows experimentally infected with *Neospora caninum* at 110 days of gestation. *Vet. Parasitol.*, 2010, **169**, 304-11.
- ALVAREZ-GARCIA G., PEREIRA-BUENO J., GOMEZ-BAUTISTA M., ORTEGA-MORA L. M. Pattern of recognition of *Neospora caninum* tachyzoite antigens by naturally infected pregnant cattle and aborted foetuses. *Vet. Parasitol.*, 2002, **107**, 15-27.
- ANDERSON M. L., REYNOLDS J. P., ROWE J. D., SVERLOW K. W., PACKHAM A. E., BARR B. C., CONRAD P. A. Evidence of vertical transmission of *Neospora* sp infection in dairy cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1997, **210**, 1169-1172.
- ANDERSON M. L., ANDRIANARIVO A. G., CONRAD P. A. Neosporosis in cattle. *Animal.Reproduction.Science.*, 2000, **60-61**, 417-431.
- ANDRIANARIVO A. G., CHOROMANSKI L., MCDONOUGH S. P., PACKHAM A. E., CONRAD P. A. Immunogenicity of a killed whole *Neospora caninum* tachyzoite preparation formulated with different adjuvants. *Int. J. Parasitol.*, 1999, **29**, 1613-25.
- ANDRIANARIVO A. G., ROWE J. D., BARR B. C., ANDERSON M. L., PACKHAM A. E., SVERLOW K. W., CHOROMANSKI L., LOUI C., GRACE A., CONRAD P. A. A POLYGEN-adjuvanted killed *Neospora caninum* tachyzoite preparation failed to prevent foetal infection in pregnant cattle following i.v./i.m. experimental tachyzoite challenge. *Int. J. Parasitol.*, 2000, **30**, 985-90.
- ANDRIANARIVO A. G., BARR B. C., ANDERSON M. L., ROWE J. D., PACKHAM A. E., SVERLOW K. W., CONRAD, P.A. Immune responses in pregnant cattle and bovine fetuses following experimental infection with *Neospora caninum*. *Parasitol. Res.*, 2001, **87**, 817-825.
- BARBER J. S., TREES A. Clinical aspects of 27 cases of neosporosis in dogs. *Vet. rec.*, 1996, **139**, 439-443.
- BARR B. C., CONRAD P. A., BREITMEYER R., SVERLOW K., ANDERSON M. L., REYNOLDS J., CHAUVET A. E., DUBEY J. P., ARDANS A. A. Congenital *Neospora* infection in calves born from cows that had previously aborted *Neospora*-infected fetuses : four cases (1990-1992). *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1993, **202**, 113-117.
- BARTLEY P. M., KIRVAR E., WRIGHT S., SWALES C., ESTEBAN-REDONDO I., BUXTON D., MALEY S. W., SCHOCK A., RAE A. G., HAMILTON C., INNES E. A. Maternal and fetal immune responses of cattle inoculated with *Neospora caninum* at mid-gestation. *J. Comp. Pathol.*, 2004, **130**, 81-91.
- BASSO W., VENTURINI L., VENTURINI M. C., HILL D. E., KWOK O. C., SHEN S. K., DUBEY J. P. First isolation of *Neospora caninum* from the feces of a naturally infected dog. *J. Parasitol.*, 2001, **87**, 612-618.
- BASZLER T. V., KNOWLES D. P., DUBEY J. P., GAY J. M., MATHISON B. A., MCELWAIN T. F. Serological diagnosis of bovine neosporosis by *Neospora caninum* monoclonal antibody-based competitive inhibition enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.*, 1996, **34**, 1423-1428.
- BASZLER T. V., GAY L. J., LONG M. T., MATHISON B. A. Detection by PCR of *Neospora caninum* in fetal tissues from spontaneous bovine abortions. *J. Clin. Microbiol.*, 1999, **37**, 4059-4064.
- BASZLER T. V., MCELWAIN T. F., MATHISON B. A. Immunization of BALB/C mice with killed *Neospora caninum* tachyzoite antigen induces a type 2 immune response and exacerbates encephalitis and neurological disease. *Clin Diagn Lab Immunol.*, 2000, **7**, 893-8.
- BJERKAS I., JENKINS M. C., DUBEY J. P. Identification and characterization of *Neospora caninum* tachyzoite antigens useful for diagnosis of neosporosis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 1994, **1**, 214-221.
- BJÖRKMAN C., JOHANSSON O., STENLUND S., HOLMDAHL O. J., UGGLA A. Neospora species infection in a herd of dairy cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1996, **208**, 1441-4.
- BROWN J. P., ZACHARY J. F., TEUSCHER C., WEIS J. J., WOOTEN R. M. Dual role of interleukin-10 in murine Lyme disease: regulation of arthritis severity and host defense. *Infect. Immun.*, 1999, **67**, 5142-50.
- CANNAS A., NAGULESWARAN A., MÜLLER N., EPERON S., GOTTSTEIN B., HEMPHILL A. Vaccination of mice against experimental *Neospora caninum* infection using NcSAG1- and NcSRS2- based recombinant antigens and DNA vaccines. *Parasitology.*, 2003, **126**, 303-12.
- CHAOUAT G., ASSAL MELIANA., MARTAL J., RAGHUPATHY R., ELLIOTT J. F., MOSMANN T., WEGMANN T. G. IL-10 prevents naturally occurring fetal loss in the CBA x DBA/2 mating combination, and local defect in IL-10 production in this abortion-prone combination is corrected by in vivo injection of IFN-tau. *J. Immunol.*, 1995, **154**, 4261-8. Erratum in: *J. Immunol.*, 2005, **175**, 3447.
- DAVISON H. C., OTTER A., TREES A. J. Significance of *Neospora caninum* in British dairy cattle

- determined by estimation of seroprevalence in normally calving cattle and aborting cattle. *Int. J. Parasitol.*, 1999a, **29**, 1189-1194.
- DAVISON H. C., OTTER A., TREES A. J. Estimation of vertical and horizontal transmission parameters of *Neospora caninum* infections in dairy cattle. *Int. J. Parasitol.*, 1999b, **29**, 1683-9.
- DEBACHE K., GUIONAUD C., ALAEDDINE F., MEVISSIN M., HEMPHILLA. Vaccination of mice with recombinant NcROP2 antigen reduces mortality and cerebral infection in mice infected with *Neospora caninum* tachyzoites. *Int. J. Parasitol.*, 2008, **38**, 1455-63.
- DE MAREZ T., LIDDELL S., DUBHEY J. P., JENKINS M. C., GASBARRE L. Oral infection of calves with *Neospora caninum* oocysts from dogs : humoral and cellular immune responses. *Int. J. Parasitol.*, 1999, **29**, 1647-1657.
- DIJKSTRA T., EYSKER M., SCHARRES G., CONRATHS F. J., WOUDA W., BARKENA H. W. Dogs shed *Neospora caninum* oocysts after ingestion of naturally infected bovine placenta but not after ingestion of colostrums spiked with *Neospora caninum* tachyzoites. *Int. J. Parasitol.*, 2001, **31**, 747-752.
- DIJKSTRA T., BARKEMA H. W., HESSELINK J. W., WOUDA W. Point source exposure of cattle to *Neospora caninum* consistent with periods of common housing and feeding and related to the introduction of a dog. *Vet. Parasitol.*, 2002, **105**, 89-98.
- DUBHEY J. P., HATTEL A. L., LINDSAY D. S., TOPPER M. J. Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs : isolation of the causative agent and experimental transmission. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1988, **193**, 1259-63.
- DUBHEY J. P., LINDSAY D. S. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. *Vet. Parasitol.*, 1996, **67**, 1-59.
- DUBHEY J. P. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. *Korean J. Parasitol.*, 2003, **41**, 1-16.
- DUBHEY J. P., SCHARRES G., ORTEGA-MORA L. M. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2007, **20**, 323-367.
- ENTRICAN G. Immune regulation during pregnancy and host-pathogen interactions in infectious abortion. *J. Comp. Pathol.*, 2002, **126**, 79-94.
- EPERON S., BRÖNNIMANN K., HEMPHILL A., GOTTSTEIN B. Susceptibility of B-cell deficient C57BL/6 ( $\mu$ MT) mice to *Neospora caninum* infection. *Parasite Immunol.*, 1999, **21**, 225-236.
- FRANKENA K. A case/control study with Bovilis Neoguard in Costa Rican dairy Herds. The 19<sup>th</sup> International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology. August 10-14 2003, New Orleans.
- GAZZINELLI R. T., WYSOCKA M., HIENY S., SCHARTON-KERSTEN T., CHEEVER A., KÜHN R., MÜLLER W., TRINCHIERI G., SHER A. In the absence of endogenous IL-10, mice acutely infected with *Toxoplasma gondii* succumb to a lethal immune response dependent on CD4<sup>+</sup> T cells and accompanied by overproduction of IL-12, IFN-gamma and TNF-alpha. *J. Immunol.*, 1996, **157**, 798-805.
- GHALMI F., CHINA B., LOSSON B. Diagnostic et surveillance épidémiologique de *Neospora caninum*. *Ann. Méd. Vét.*, 2007, **151**, 123-149.
- GONDIM L. F., GAO L., MCALLISTER M. M. Improved production of *Neospora caninum* oocysts, cyclical oral transmission between dogs and cattle, and *in vitro* isolation from oocysts. *J. Parasitol.*, 2002, **88**, 1159-1163.
- GONDIM L. F., MCALLISTER M. M., PITT W. C., ZEMLICKA D. E. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int. J. Parasitol.*, 2004, **34**, 159-161.
- GUY C. S., WILLIAMS D. J. L., KELLY D. F., MCGARRY J. W., GUY F., BJÖRKMAN C., SMITH R. F., TREES A. J. *Neospora caninum* in persistently infected, pregnant cows : spontaneous transplacental infection is associated with an acute increase in maternal antibody. *Vet. Rec.*, 2001, **149**, 443-9.
- HALDORSON G. J., MATHISON B. A., WENBERG K., CONRAD P. A., DUBHEY J. P., TREES A. J., YAMANE I., BASZLER T. V. Immunization with native surface protein NcSRS2 induces a Th2 immune response and reduces congenital *Neospora caninum* transmission in mice. *Int. J. Parasitol.*, 2005, **35**, 1407-15.
- HEMPHILL A. Subcellular localization and functional characterization of Nc-p43, a major *Neospora caninum* tachyzoite surface protein. *Infect. Immun.*, 1996, **64**, 4279-87.
- HEMPHILL A. The host-parasite relationship in neosporosis. *Adv. Parasitol.*, 1999, **43**, 47-104.
- HEMPHILL A., MÜLLER N., SAGER H., GOTTSTEIN B. *Neospora caninum* and neosporosis-basic science at the Institute of Parasitology and possible implications. *Schweiz. Arch. Tierheilkd.*, 2000, **142**, 257-61.
- HEUER C., NICHOLSON C., RUSSELL D., WESTON J. A controlled study with Bovilis Neoguard in New Zealand dairy herds. The 19<sup>th</sup> International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology. August 10-14 2003, New Orleans.
- INNES E. A., PANTON W. R. M., SANDERSON A., THOMSON K. M., WASTLING J. M., MALEY S., BUXTON D. Induction of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell response in efferent lymph responding to *Toxoplasma gondii* infection : analysis of phenotype and function. *Parasite Immunol.*, 1995, **17**, 151-160.
- INNES E. A., WRIGHT S. E., MALEY S., RAE A., SCHOCK A., KIRVAR E., BARTLEY P., HAMILTON C., CAREY I. M., BUXTON D. Protection against vertical transmission in bovine neosporosis. *Int. J. Parasitol.*, 2001, **31**, 1523-34.
- INNES E. A., ANDRIANARIVO A. G., BJÖRKMAN C., WILLIAMS D. J., CONRAD P. A. Immune responses to *Neospora caninum* and prospects for vaccination. *Trends Parasitol.*, 2002, **18**, 497-504.
- INNES E. A., WRIGHT S., BARTLEY P., MALEY S., MACALDOWIE C., ESTEBAN-REDONDO I.,

- BUXTON D. The host-parasite relationship in bovine neosporosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 2005, **108**, 29-36.
- INNES E. A. The host-parasite relationship in pregnant cattle infected with *Neospora caninum*. *Parasitology.*, 2007, **134**, 1903-10.
- JENSEN A. M., BJÖRKMAN C., KJELDSEN A. M., WEDDERKOPP A., WILLADSEN C., UGGLA A., LIND P. Associations of *Neospora caninum* seropositivity with gestation number and pregnancy outcome in Danish dairy herds. *Prev. Vet. Med.*, 1999, **43**, 139-40.
- KALINSKI P., HILKENS C. M., SNIJDERS A., SNIJDEWINT F. G., KAPSENBERG M. L. Dendritic cells, obtained from peripheral blood precursors in the presence of PGE2, promote Th2 responses. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 1997, **417**, 363-7.
- KANO R., MASUKATA Y., OMATA Y., KOBAYASHI Y., MAEDA R., SAITO A. Relationship between type 1/type 2 immune responses and occurrence of vertical transmission in BALB/c mice infected with *Neospora caninum*. *Vet. Parasitol.*, 2005, **20**, 159-64.
- KHAN I. M., SCHWARTZMAN J. D., FONSEKA S., KASPER L.H. *Neospora caninum* : role for immune cytokines in host immunity. *Exp. Parasitol.*, 1997, **85**, 24-34.
- KOSSODO S., MONSO C., JUILLARD P., VELU T., GOLDMAN M., GRAU G. E. Interleukin-10 modulates susceptibility in experimental cerebral malaria. *Immunology.*, 1997, **91**, 536-40.
- LIDDELL S., JENKINS M. C., DUBEY J. P. A competitive PCR assay for quantitative detection of *Neospora caninum*. *Int. J. Parasitol.*, 1999, **29**, 1583-1587.
- LIDDELL S., PARKER C., VINYARD B., JENKINS M., DUBEY J. P. Immunization of mice with plasmid DNA coding for NcGRA7 or NcHSP33 confers partial protection against vertical transmission of *Neospora caninum*. *J. Parasitol.*, 2003, **89**, 496-500.
- LINDSAY D. S., DUBEY J. P. *Neospora caninum* (Protozoa: apicomplexa) infections in mice. *J. Parasitol.*, 1989, **75**, 772-9.
- LINDSAY D. S., BLAGBURN B. L., DUBEY J. P. Factors affecting the survival of *Neospora caninum* bradyzoites in murine tissues. *J. Parasitol.*, 1992, **78**, 70-72.
- LONG M. T., BASZLER T. V. Fetal loss in BALB/c mice infected with *Neospora caninum*. *J. Parasitol.*, 1996, **82**, 608-11.
- LONG M. T., BASZLER T. V., MATHISON B. A. Comparison of intracerebral parasite load, lesion development, and systemic cytokines in mouse strains infected with *Neospora caninum*. *J. Parasitol.*, 1998, **84**, 316-20.
- LONG M. T., BASZLER T.V. Neutralisation of maternal IL-4 modulates congenital protozoal transmission : comparison of innate versus acquired immune responses. *J. Immunol.*, 2000, **164**, 4768-4774.
- LOPEZ-GATIUS F., LOPEZ-BEJAR M., MURUGAVEL K., PABON M., FERRER D., ALMERIA S. *Neospora*-associated abortion episode over a 1-year period in a dairy herd in north-east Spain. *J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health.*, 2004, **51**, 348-52.
- LUNDEN A., MARKS J., MALEY S. W., INNES E. A. Cellular immune responses in cattle experimentally infected with *Neospora caninum*. *Parasite. Immunol.*, 1998, **20**, 519-26.
- LUNDEN A., WRIGHT S., ALLEN J. E., BUXTON D. Immunisation of mice against neosporosis. *Int. J. Parasitol.*, 2002, **32**, 867-76.
- MALEY S. W., BUXTON D., THOMSON K. M., SCHRIEFER C. E., INNES E. A. Serological analysis of calves experimentally infected with *Neospora caninum* : a 1-year study. *Vet. Parasitol.*, 2001, **96**, 1-9.
- MCALLISTER M. M., DUBEY J. P., LINDSAY D. S., JOLLEYW R., WILLS R.A., MCGUIRE A.M. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int. J. Parasitol.*, 1998, **28**, 1473-1478.
- MCALLISTER M. M., BJÖRKMAN C., ANDERSON-SPRECHER R., ROGERS D. G. Evidence of point-source exposure to *Neospora caninum* and protective immunity in a herd of beef cows. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 2000, **217**, 881-887.
- MOEN A. R., WOUDA W., MUL M. F., GRAAT E. A., VAN WERVEN T. Increased risk of abortion following *Neospora caninum* abortion outbreaks : a retrospective and prospective cohort study in four dairy herds. *Theriogenology.*, 1998, **49**, 1301-1309.
- NISHIKAWA Y., XUAN X., NAGASAWA H., IGARASHI I., FUJISAKI K., OTSUKA H., MIKAMI T. Monoclonal antibody inhibition of *Neospora caninum* tachyzoite invasion into host cells. *Int. J. Parasitol.*, 2000, **30**, 51-8.
- NISHIKAWA Y., KOUSAKA Y., TRAGOOLPUA K., XUAN X., MAKALA L., FUJISAKI K., MIKAMI T., NAGASAWA H. Characterization of *Neospora caninum* surface protein NcSRS2 based on baculovirus expression system and its application for serodiagnosis of *Neospora* infection. *J. Clin. Microbiol.*, 2001a, **39**, 3987-91.
- NISHIKAWA Y., XUAN X., NAGASAWA H., IGARASHI I., FUJISAKI K., OTSUKA H., MIKAMI T. Prevention of vertical transmission of *Neospora caninum* in BALB/c mice by recombinant vaccinia virus carrying NcSRS2 gene. *Vaccine.*, 2001b, **19**, 1710-6.
- NISHIKAWA Y., TRAGOOLPUA K., INOUE N., MAKALA L., NAGASAWA H., OTSUKA H., MIKAMI T. In the absence of endogenous gamma interferon, mice acutely infected with *Neospora caninum* succumb to a lethal immune response characterized by inactivation of peritoneal macrophages. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 2001c, **8**, 811-6.
- NISHIKAWA Y., MAKALA L., OTSUKA H., MIKAMI T., NAGASAWA H. Mechanisms of apoptosis in murine fibroblasts by two intracellular protozoan parasites, *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum*. *Parasite. Immunol.*, 2002, **24**, 347-54.
- NISHIKAWA Y., INOUE N., MAKALA L., NAGASAWA H. A role for balance of interferon-gamma and interleukin-4 production in protective immunity against *Neospora caninum* infection. *Vet. Parasitol.*, 2003, **116**, 175-84.
- OMATA Y., NIDAIIRA M., KANO R., KOBAYASHI Y., KOYAMA

- T., FURUOKA H., MAEDA R., MATSUI T., SAITO A. vertical transmission of *Neospora caninum* in BALB/C mice in both acute and chronic infection. *Vet. Parasitol.*, 2004, **121**, 323-8.
- OSBURN B. I. The ontogeny of the ruminant immune system and its significance in the understanding of maternal-fetal-neonatal relationships. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 1981, **137**, 91-103.
- OSBURN B. I., MACLACHLAN N. J., TERRELL T. G. Ontogeny of the immune system. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1982, **181**, 1049-52.
- PARE J., THURMOND M. C., HIETALA S. K. Congenital *Neospora caninum* infection in dairy cattle and associated calfhood mortality. *Can. J. Vet. Res.*, 1996, **60**, 133-139.
- PARE J., THURMOND M. C., HIETALA S. K. *Neospora caninum* antibodies in cows during pregnancy as a predictor of congenital infection and abortion. *J. Parasitol.*, 1997, **83**, 82-87.
- QUINN H. E., MILLER C. M., ELLIS J. T. The cell-mediated immune response to *Neospora caninum* during pregnancy in the mouse is associated with a bias towards production of interleukin-4. *Int. J. Parasitol.*, 2004, **34**, 723-32.
- RETTIGNER C. Pathogeny of *Neospora caninum* abortions : study of the relationship between immune response and pregnancy in murine and sheep models of congenital neosporosis. Thèse de doctorat, Université de Liège, 2004.
- RETTIGNER C., LECLIPTEUX T., DE MEERSCHMAN F., FOCANT C., LOSSON B. Survival, immune responses and tissue cyst production in outbred (Swiss white) and inbred (CBA/Ca) strains of mice experimentally infected with *Neospora caninum* tachyzoites. *Vet. Res.*, 2004, **35**, 225-32.
- RETTIGNER C., DE MEERSCHMAN F., LASRI S., FOCANT C., LOSSON B. La neosporose chez le bétail: aspects épidémiologiques, diagnostiques et immunologiques. SPF. Santé Publique, Sécurité de la Chaîne alimentaire et Environnement. Bruxelles., 2004, 74p.
- RITTER D. M., KERLIN R., SIBERT G., BRAKE D. Immune factors influencing the course of infection with *Neospora caninum* in the murine host. *J. Parasitol.*, 2002, **88**, 271-280.
- ROMERO J. J., PEREZ E., FRANKENA K. Effect of a killed whole *Neospora caninum* tachyzoite vaccine on the crude abortion rate of Costa Rican dairy cows under field conditions. *Vet. Parasitol.*, 2004, **123**, 149-159.
- ROMERO J. J., BRENDA S. V., VARGAS B., DOLZ G., FRANKENA K. Effect of neosporosis on productive and reproductive performance of dairy cattle in Costa Rica. *Theriogenology.*, 2005, **64**, 1928-39.
- SCHARES G., PETERS M., WURM R., BARWALD A., CONRATHS F. J. The efficiency of vertical transmission of *Neospora caninum* in dairy cattle analysed by serological techniques. *Vet. Parasitol.*, 1998, **80**, 87-98.
- SCHARES G., HEYDORN A. O., CÜPPERS A., CONRATHS F. J., MEHLHORN H. Cyclic transmission of *Neospora caninum*: serological findings in dogs shedding oocysts. *Parasitol. Res.*, 2001, **87**, 873-7.
- SHIBAHARA T., KOKUHO T., ETO M., HARITANI M., HAMAOKA T., SHIMURA K., NAKAMURA K., YOKOMIZO Y., YAMANE I. Pathological and immunological findings of athymic nude and congenic wild type BALB/c mice experimentally infected with *Neospora caninum*. *Vet. Pathol.*, 1999, **36**, 321-7.
- SNAPPER C. M., FINKELMAN F. D. Immunological class switching. *Fundamental Immunology*. 3<sup>rd</sup>edn (ed. by W.E. Paul), 1993, pp. 337-364., Raven Press, New-York.
- SPEER C. A., DUBEY J. P. Ultrastructure of sporozoites and zoites of *Hammondia heydorni*. *J. Protozool.* 1989, **36**, 488-93.
- SPENCER J. A., HIGGINBOTHAM M. J., YOUNG-WHITE R. R., GUARINO A. J., BLAGBURN B. L. *Neospora caninum*: adoptive transfer of immune lymphocytes precipitates disease in BALB/c mice. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 2005, **106**, 329-33.
- STASKA L. M., MCGUIRE T. C., DAVIES C. J., LEWIN H. A., BASZLER T.V. *Neospora caninum*-infected cattle develop parasite-specific CD4+ cytotoxic T lymphocytes. *Infect. Immun.*, 2003, **71**, 3272-9.
- STASKA L. M., DAVIES C. J., BROWN W. C., MCGUIRE T. C., SUAREZ C. E., PARK J. Y., MATHISON B. A., ABBOTT J. R., BASZLER T. V. Identification of vaccine candidate peptides in the NcSRS2 surface protein of *Neospora caninum* by using CD4+ cytotoxic T lymphocytes and gamma interferon-secreting T lymphocytes of infected holstein cattle. *Infect. Immun.*, 2005, **73**, 1321-9.
- TAGA K., TOSATO G. IL-10 inhibits human T cell proliferation and IL-2 production. *J. Immunol.*, 1992, **148**, 1143-8.
- TANAKA T., HAMADA T., INOUE N., NAGASAWA H., FUJISAKI K., SUZUKI N., MIKAMI T. The role of CD4+ or CD8+ T cells in the protective immune response of BALB/c mice to *Neospora caninum* infection. *Vet. Parasitol.*, 2000, **90**, 183-191.
- TEIXEIRA L., BOTELHO A. S., MESQUITA S. D., CORREIA A., CERCAF., COSTA R., SAMPAIO P., CASTRO A. G., VILANOVA M. Plasmacytoid and conventional dendritic cells are early producers of IL-12 in *Neospora caninum*-infected mice. *Immunol. Cell Biol.* 2010, **88**, 79-86.
- THOUVENIN M., CANDOLFI E., VILLARD O., KLEIN J. P., KIEN T. Immune response in a murine model of congenital toxoplasmosis: increased susceptibility of pregnant mice and transplacental passage of *Toxoplasma gondii* are type 2-dependent. *Parassitologia.*, 1997, **39**, 279-83.
- THURMOND M. C., HIETALA S. K. Effect of congenitally acquired *Neospora caninum* infection on risk of abortion and subsequent abortions in dairy cattle. *Am. J. Vet. Res.*, 1997, **58**, 1381-5.
- TRANAS J., HEINZEN R. A., WEISS L. M., MCALLISTER M. M. Serological evidence of human infection with the protozoan *Neospora caninum*. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 1999, **6**, 765-7.
- TRINCHIERI G. Biological properties and therapeutic applications

- of interleukin-12. *Eur. Cytokine Netw.*, 1997, **8**, 305-7.
- WALDNER C. L., JANZEN E. D., RIBBLE C. S. Determination of the association between *Neospora caninum* infection and reproductive performance in beef herds. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1998, **213**, 685-90.
- WEGMANN T. G., LIN H., GUILBERT L., MOSMANN T., R. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? *Immunol. Today.*, 1993, **14**, 353-6.
- WILCZYNSKI J. R. Immunological analogy between allograft rejection, recurrent abortion and pre-eclampsia - the same basic mechanism? *Hum. Immunol.*, 2006, **67**, 492-511.
- WILLIAMS D. J., GUY C. S., MCGARRY J. W., GUY F., TACKER L., SMITH R. F., MACEACHERN K., CRIPPS P. J., KELLY D. F., TREES A. J. *Neospora caninum*-associated abortion in cattle: the time of experimentally-induced parasitaemia during gestation determines foetal survival. *Parasitology.*, 2000, **121**, 347-58.
- WILLIAMS D. J., GUY C. S., SMITH R. F., GUY F., MCGARRY J. W., MCKAY J. S., TREES A. J. First demonstration of protective immunity against foetopathy in cattle with latent *Neospora caninum* infection. *Int. J. Parasitol.*, 2003, **33**, 1059-65.
- WOUDA W., MOEN A. R., SCHUKKEN Y. H., Abortion risk in progeny of cows after a *Neospora caninum* epidemic. *Theriogenology.*, 1998, **49**, 1311-1316.
- YAMANE I., KITANI H., KOKUHO T., SHIBAHARA T., HARITANI M., HAMAOKA T., SHIMIZU S., KOIWAI M., SHIMURA K., YOKOMIZO Y. The inhibitory effect of interferon gamma and tumor necrosis factor alpha on intracellular multiplication of *Neospora caninum* in primary bovine brain cells. *J. Vet. Med. Sci.*, 2000, **62**, 347-51.
- ZHANG G., HUANG X., BOLDBAATAR D., BATTUR B., BATTSETSEG B., ZHANG H., YU L., LI Y., LUO Y., CAO S., GOO Y. K., YAMAGISHI J., ZHOU J., ZHANG S., SUZUKI H., IGARASHI I., MIKAMI T., NISHIKAWA Y., XUAN X. Construction of *Neospora caninum* stably expressing TgSAG1 and evaluation of its protective effects against *Toxoplasma gondii* infection in mice. *Vaccine.*, 2010, **28**, 7243-7.