

L'immunité dans la toxoplasmose expérimentale

PAR

J. JADIN, J. FRANÇOIS, M. WERY et J. VAN DE CASTEELE

Résumé — Les auteurs, en infectant par voie dermique des lapins avec la souche de *Toxoplasma gondii* C. B., ont pu observer que les anticorps, inexistant pendant les deux premiers mois, se développaient spectaculairement après l'inoculation d'extraits de rate formolée et permettaient de protéger les animaux.

L'humeur aqueuse renfermait des anticorps mis en évidence par immunofluorescence.

L'inoculation préalable de ces mêmes extraits ou d'autres extraits tués ne confère pas une immunité suffisante.

Le travail que nous allons rapporter avait comme but de montrer la présence d'anticorps anti-toxoplasmiques dans l'humeur aqueuse. Pour y parvenir, nous voulions immuniser les animaux en expérience au maximum, car des essais antérieurs nous avaient montré que chez des lapins infectés, on ne parvenait pas à mettre en évidence ces anticorps.

Nous avons tenté tout d'abord d'inoculer des ascites de souris toxoplasmiques dans l'humeur aqueuse de six lapins, mais nous ne pûmes observer qu'un décès rapide consécutif à l'introduction de produits contaminés de toxoplasmes dans la chambre antérieure de l'œil.

Aussi avons-nous repris nos essais d'une manière moins brutale. La souche utilisée est celle que nous entretenons à l'Institut de Médecine tropicale d'Anvers depuis quinze ans et qui a été isolée à Stanleyville par Wiktor (1950) à partir du lapin. Cette souche est entretenue par passage bi-hebdomadaire d'ascite toxoplasmique de souris à souris. Elle tue régulièrement cet animal après quatre à six jours. Nous avons eu recours à la voie intradermique comme moyen de pénétration du parasite et à de gros lapins dont le *Dye test* était négatif afin d'obtenir une évolution lente de la maladie. L'inoculation

a été faite dans la peau rasée à raison de trois injections de deux dixièmes de millilitre contenant environ 25.000.000 de parasites par millilitre.

Pour tester les anticorps, nous nous sommes inspirés des recherches de Käss et Steen (1951) qui avaient utilisé la souche classique RH. Ces auteurs qui avaient employé en premier lieu la voie péritonéale, avaient observé la survie d'un seul animal sur six. Aussi furent-ils obligés de traiter simultanément les animaux en expérience à l'auréomycine afin d'observer la montée des anticorps ce qui leur permit d'obtenir une survie de cinq animaux sur six. Pour eux le *Dye test* est plus sensible que la déviation du complément et permet de mieux suivre l'évolution des anticorps. Ils purent, en effet, observer des taux de 1/81.920 trente jours après l'inoculation des toxoplasmes. Ce sont ces essais qui nous ont amené à choisir le *Dye test*, quitte à le faire compléter par la fixation du complément, mais nous voulions observer l'évolution des anticorps, sans modifier les toxoplasmes. En effet, en tuant les parasites par l'auréomycine, Käss et Steen augmentaient leur pouvoir antigénique et modifiaient ainsi l'évolution de la maladie; l'organisme élaborant des anticorps capables de protéger l'animal.

Au cours d'essais préliminaires, nous avons simplement inoculé nos animaux par voie intradermique ce qui entraînait des manifestations pathologiques, locales et générales. Aux endroits d'inoculation on pouvait observer une papule rapidement entourée d'une zone œdématisée, qui allait vers l'ulcération. Dans le liquide qui suintait, on pouvait retrouver des toxoplasmes. Dans la suite les animaux maigrissaient et après plusieurs semaines présentaient un état de cachexie telle que la mort s'en suivait.

Cependant si nous examinions le sérum de ces animaux d'expérience au *Dye test* nous observions avec étonnement que cette réaction restait négative même après deux mois. C'est cette observation, sans doute en contradiction avec plusieurs publications, qui nous a amené à rechercher le moyen de faire apparaître les anticorps, car le but premier de notre étude était de rechercher une technique capable de déceler les anticorps dans l'humeur aqueuse et il ne pouvait être question de mettre ceux-ci en évidence s'ils n'existaient pas dans le sang circulant.

C'est ainsi que nous avons été amenés à instaurer une première série d'essais en inoculant en premier lieu des lapins avec les toxoplasmes vivants puis avec des toxoplasmes tués. Dans une seconde série, nous inoculons en premier lieu des antigènes tués, puis des toxoplasmes virulents.

1. *La première série* comportait onze lapins. Deux d'entre eux ont reçu une inoculation de toxoplasmes vivants, non suivie d'injection d'antigène. Ce sont les animaux témoins.

Les neuf autres ont reçu, après l'inoculation de parasites vivants, quatre injections sous-cutanées d'antigène toxoplasmique (broyat de rate toxoplasmique formolée à deux pour mille).

Les deux animaux témoins sont morts au cours du troisième mois qui a suivi l'infestation.

TABLEAU 1

Dye test

Lapin n°	Avant toute inoculation	Deux mois après inoculation de toxoplasmes vivants	Après quatre injections de rate toxoplasmique formolée brute
1	nég.	nég.	1/16.384
2	nég.	nég.	1/16.384
3	nég.	1/32	1/8.192
4	nég.	nég.	1/16.384
5	nég.	nég.	mort
6	nég.	mort	mort
7	nég.	nég.	1/16.384
8	nég.	nég.	1/8.192
9	nég.	nég.	1/16.384
Témoins :			
10	nég.	nég.	Pas d'injection, mort 1/64
11	nég.	nég.	Pas d'injection, mort

Parmi les neuf animaux en « expérience » deux sont morts d'infection intercurrente avant le début des injections d'antigènes; deux ont montré un taux d'anticorps de 1/192 au *Dye test* et cinq atteignaient un taux d'anticorps de 1/16.384 à ce même *Dye test*. En même temps que ces antigènes se développent la santé générale des lapins s'améliore et l'animal résiste à l'infection.

Notons que le taux de fixation du complément est parallèle au *Dye-test*. Après inoculation de toxoplasmes, il est de 1/8 à 1/64 tandis qu'après l'injection d'antigène formolé il monte à 1/512.

Nous constatons donc une élévation spectaculaire du taux des anticorps quand les animaux qui font une infection toxoplasmique reçoivent au cours de l'évolution de celle-ci des injections sous-cutanées d'antigènes toxoplasmiques formolés.

Lors de leur étude sur l'immunisation du cobaye par le toxoplasme, Cutchins et Warren (1956) avaient observé que la nature de l'antigène tué était très important et que les toxoplasmes entiers et formolés possédaient le meilleur pouvoir antigénique. Les résultats sont moins bons avec des antigènes préparés avec des toxoplasmes détruits par les ultrasons ou par congélation et réchauffement successifs.

Pour compléter ces résultats, nous avons effectué chez six animaux la recherche des anticorps fluorescents suivant la technique de Goldmann (1957) et nous avons pu confirmer les résultats précédents.

Nous avons aussi recherché si l'humeur aqueuse des lapins pouvait contenir des anticorps antitoxoplasmiques. Dans ce but nous avons ponctionné la chambre antérieure de l'œil à deux reprises et à six heures d'intervalle, soit à dix heures l'humeur aqueuse première et à seize heures l'humeur aqueuse seconde. Il n'a pas été possible vu la faible quantité de liquide recueilli, de pratiquer le *Dye test* et la fixation du complément. Nous nous sommes limités à la recherche des anticorps fluorescents et nous avons pu constater une réaction nettement plus forte avec l'humeur aqueuse seconde qu'avec l'humeur aqueuse première.

2. *La seconde série* comporte huit lapins, qui reçoivent en premier lieu des antigènes tués et ensuite des toxoplasmes vivants. Tous les animaux ont au départ un *Dye test* négatif.

Les deux premiers lapins (12 et 13) reçoivent quatre injections d'ascite toxoplasmique formolée puis deux mois après des toxoplasmes virulents par voie intradermique.

Les deux suivants (14 et 15) reçoivent quatre injections de rate toxoplasmiques formolée brute, puis deux mois après des toxoplasmes virulents par voie intradermique.

Les deux suivants (16 et 17) reçoivent quatre injections de rate toxoplasmique phéniquée brute, puis deux mois après de toxoplasmes virulents par voie intradermique.

Les deux derniers (18 et 19) reçoivent quatre injections de rate formolée et filtrée.

TABLEAU 2

Dye test

Lapin n°	Avant toute inoculation	Après quatre injections d'antigène	Après inoculation de toxoplasmes virulents
12 13	nég. nég.	<i>Ascite formolée brute</i> nég. 1/32	1/1024 mort, toxoplasmes retrouvés
14 15	nég. nég.	<i>Rate formolée brute</i> 1/2.048 1/32	1/1024 1/1024
16 17	nég. nég.	<i>Rate phéniquée brute</i> nég. nég.	mort, toxoplasmes retrouvés mort
18 19	nég. nég.	<i>Rate formolée filtrée</i> nég. nég.	mort, toxoplasmes retrouvés 1/1024

Nous observons qu'après quatre injections d'ascite formolée toxoplasmique, le taux des anticorps au *Dye test* est négatif pour un animal et positif à 1/32 pour l'autre.

Pour le premier animal, deux mois après l'inoculation de toxoplasmes vivants le taux du *Dye test* s'élève à 1/1024 et cet animal survit tandis que le second qui avait pourtant un *Dye-test* à 1/32 succombe et ces organes renferment des toxoplasmes capables de tuer la souris.

La rate formolée se montre nettement plus antigénique; en effet, un des animaux présente deux mois après avoir reçu quatre injections d'antigène formolé un *Dye test* positif aux taux de 1/2048, mais l'autre ne possède qu'un taux faible à 1/32. Cependant après l'inoculation de toxoplasmes virulents les deux lapins survivent.

La rate phéniquée brute semble être dépourvue de pouvoir antigénique, aucun des deux animaux ne présente d'anticorps et après inoculation de toxoplasmes virulents, tous deux meurent et on retrouve des toxoplasmes chez l'un d'eux.

La rate formolée filtrée ne donne pas d'anticorps décelables au *Dye test* chez les animaux inoculés, mais un animal après avoir reçu des toxoplasmes vivants survit et présente un *Dye test* positif à 1/1024, tandis que l'autre meurt et ses organes sont remplis de toxoplasmes.

Nous constatons par ces essais que la rate toxoplasmique formolée s'est montrée la plus apte à immuniser les animaux; le taux d'anticorps ne s'élève cependant pas à des taux aussi spectaculaires que ceux observés par Käss et Steen, ni aux taux qui apparaissent lorsque les animaux ont reçu des toxoplasmes vivants en premier lieu.

Discussion

Il ressort de ces observations que les réactions sérologiques peuvent rester négatives au cours de la toxoplasmose. C'est d'ailleurs ce qu'Engelbrecht et Franceschetti (1963) viennent de signaler chez l'homme et ce qu'avait observé Muller (1955) en isolant des toxoplasmes dans un cas de chorio-rétinite congénitale où les anticorps n'avaient pas été décelés.

Nakayama, Toguchi, Miyasato, Uehara et Shimabukuro (1964) signalent avoir isolé des toxoplasmes à partir d'un liquide céphalo-rachidien chez un enfant dont le *Dye test* était négatif.

Lors du Congrès de Parasitologie de Rome en septembre 1964, Jacobs a rapporté plusieurs cas humains où le toxoplasme a été isolé alors que le *Dye test* était négatif.

Ces essais nous montrent que, chez les animaux dont l'immunité est lente à s'établir ou inexistante, les anticorps se développent rapidement dès que l'animal infecté et porteur de parasites est traité par un antigène toxoplasmique formolé. De plus, les anticorps issus de cette immunisation sont capables de protéger l'animal et de le guérir. On peut retrouver ces anticorps dans l'humeur aqueuse par immunofluorescence.

Cette notion d'immunisation par l'antigène formolé n'est sans doute pas à négliger dans la conduite du traitement de la toxoplasmose et rencontre les essais fructueux de Jirovec et de ses collaborateurs (1963) qui confirment l'opinion de Fair (1959), ainsi que les travaux de Cutchins et Warren (1956) qui ont pu immuniser des cobayes avec des antigènes tués, modifiés par un adjuvant suivant la méthode de Freund.

L'apparition d'un taux élevé d'anticorps après l'inoculation d'antigène formolé peut de plus éclairer le diagnostic.

Samenvatting — De auteurs hebben, na het infecteren lang dermale weg van konijnen met een stam van *Toxoplasma gondii* C. B., vastgesteld dat de antilichamen, onbestaande gedurende de eerste twee maanden, zich na inoculatie van met formol behandeld miltextract opzienbarend ontwikkelen, wat toeliet de dieren te beschermen.

Het waterig vocht liet antilichamen in, door immunofluorescentie aangetoond.

Voorafgaandelijke inoculatie van dezelfde of andere dode extracten verleent geen voldoende immuniteit.

Summary — The authors after infecting rabbits by the dermal route with *T. gondii* have noted that no antibodies were present for the first 2 months but they developed spectacularly after the inoculation of formalized spleen extracts and protected the animals.

The aqueous humour also contained antibodies as shown by immunofluorescence.

Inoculation beforehand of the same extracts or of other killed extracts did not confer adequate immunity.

Zusammenfassung — Die Verfasser beobachteten nach intradermaler Infektion von Kaninchen mit einem Stamm von *Toxoplasma gondii* C. B. das Auftreten von Antikörpern, die in den ersten beiden Monaten nicht nachweisbar waren. Diese entwickelten sich in auffälliger Form nach Inokulation von mit Formol behandeltem Milzextrakt und ergaben eine Schutzwirkung bei Tieren.

Wässrige Suspensionen enthielten Antikörper, die durch Immunofluoreszenz nachzuweisen waren.

Eine vorbeugende Verabfolgung dieser oder anderer abgetöteter Extrakte verlieh keine ausreichende Immunität.

Resumen — Los autores, infectando por vía dérmica conejos con la cepa de *Toxoplasma gondii* C. B. han podido observar que los anticuerpos, inexistentes durante los dos primeros meses, se desarrollaban espectacularmente tras la inoculación de extractos de bazo formolado y permitían proteger a los animales.

El humor acuoso contenía anticuerpos puestos en evidencia por inmunofluorescencia.

La inoculación previa de esos mismos extractos o de otros muertos no confiere una inmunidad suficiente.

Ce travail a été effectué au département de Protozoologie de l'Institut de Médecine tropicale Prince Léopold à Anvers et à la Clinique Ophtalmologique de l'Université de Gand et reçu pour publication le 23 novembre 1964.

BIBLIOGRAPHIE

- Cutchins, E. C. et Warren, J., Immunity patterns in the guinea following toxoplasma infection and vaccination with killed toxoplasma. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.*, 1956, 5, 197.
- Engelbrecht, E. et Franceschetti, A., Isolement de *Toxoplasma gondii* dans un cas de chorioretinite sera négative. *Pathologia et Microbiol. Basle*, 1963, 26, 731.

- Fair, J. R., Stimulation of *Dye test* antibodies in human volunteers using heat-killed toxoplasma. Amer. J. Ophtalm., 1959, **48**, 322.
- François, J., La toxoplasmose et ses manifestations oculaires. Paris, Masson et Cie, 1963, 39.
- Goldmann, M., Staining *Toxoplasma gondii* fluorescein labelled antibody II. A new serologic test for antibodies to toxoplasma based upon inhibition of specific staining. J. Exper. Med., 1957, **105**, 557.
- Jira, J., Jirovec, O., Fencel, O., Blaha, F. et Bozdech, V., Desensibilisierungsversuche mit Toxoplasmin. Ztschr. ärztl. Fortbild., 1963, **57**, 944.
- Käss, E. et Steen, E., Serological investigation of rabbits experimentally infected with *Toxoplasma gondii*. Acta path. et microb. scandinavica, 1951, **28**, 169.
- Muller, F., Demonstration mehrerer typischer Fälle von Toxoplasmosen. Klin. Mbl. Augenh., 1955, **127**, 105.
- Nakayam, T., Toguchi, S., Migyasato, E., Uehara, N. et Shimabukuro, T., A case of report of human toxoplasmosis from which *Toxoplasma gondii* was isolated in Okinawa Island. Endem. Dis. Bull. Nagasaki Univ., 1964, **6**, 13.
- Wiktor, I. J., Toxoplasmose animale. Sur une épidémie de lapins et de pigeons à Stanleyville (Congo belge). Ann. Soc. belge Méd. trop., 1950, **30**, 97.
-