

THÈSE DE DOCTORAT EN SCIENCES VÉTÉRINAIRES

Résumé

Orientation : Médecine Vétérinaire
ou Santé et Productions Animales

Titre de la thèse en français :

Optimisation et rationalisation de l'immunisation du bétail de la Zambie de l'Est contre *Theileria parva*

Titre de la thèse en anglais :

Optimisation and rationalisation of cattle immunisation against *Theileria parva* in Eastern Zambia

Candidat : Tanguy Marcotty

Promoteur : Prof. B. Losson

Co-promoteur : Dr. J. Brandt (Institut de Médecine Tropicale Prince Léopold, Anvers)

Département et Service : département de Santé Animale, Institut de Médecine Tropicale Prince Léopold, Anvers

Date de la défense publique : le 13 juin 2003

Composition du Jury : P. Lekeux, B. Goddeeris, G. Uilenberg, J. Belot, J.-M. Godeau, D. Desmecht, P. Leroy, A. Vanderplasschen, A. Linden

DESCRIPTION DU SUJET DE RECHERCHE ABORDÉ

L'«East Coast fever» (ECF) est une maladie aiguë et souvent létale des bovins. On la rencontre en Afrique Orientale, Centrale et Australe. Son agent étiologique, *Theileria parva* est un protozoaire transmis de manière transstadiale au bétail par *Rhipicephalus appendiculatus*, une tique à trois hôtes. Les animaux qui en guérissent développent une immunité solide contre les infections homologues. Il existe cependant de nombreuses souches antigéniquement différentes vis-à-vis desquelles l'immunité croisée de l'hôte est inconstante.

L'immunisation contre *T. parva* par la technique dite de l'infection et traitement est pratiquée en Zambie de l'Est depuis 1986. Elle consiste en l'inoculation simultanée de stabilat de sporozoïtes cryopréservés et de tétracycline à longue durée d'action. Au début de ce travail, en 1993, l'immunisation contre l'ECF était encore exécutée gratuitement par des experts expatriés se déplaçant en véhicules tout terrain. Les stabilats de sporozoïtes étaient emmenés sur le terrain en conteneurs d'azote liquide et la tétracycline la plus chère du marché était utilisée comme agent chimiothérapeutique. L'infectivité des stabilats vaccinaux était estimée *in vivo* seulement.

La thèse sur laquelle repose ce travail est que l'immunisation contre l'ECF par la technique de l'infection et traitement est adaptée aux conditions épidémiologiques qui prévalent en Zambie de l'Est et qu'il est possible de l'adapter aux contraintes pratiques, de simplifier son stockage et sa distribution, de réduire son coût tout en conservant sa qualité et son efficacité.

RÉSULTATS

Deux études épidémiologiques longitudinales conduites dans la province de l'Est de la Zambie, l'une en région enzootique et l'autre en région épizootique ont permis de caractériser ces états épidémiologiques. L'influence du climat sur la phénologie des tiques et leur capacité vectorielle a été démontrée. Le développement d'une seconde génération de tiques au cours d'une année semble important pour l'épidémiologie de l'ECF puisque cette seconde génération permet aux stades infectants et infectables du vecteur de se trouver simultanément sur le même hôte. En outre, elle permet de réduire l'intervalle entre l'infection des nymphes et le transfert de l'infection par les adultes. L'effet délétère de cet intervalle sur l'infectivité de *T. parva* a été confirmé.

Alors que l'enzootie semble inévitable, la sévérité des réactions cliniques observées sur le terrain ne permet pas d'envisager l'installation d'une stabilité endémique. Il convient donc de protéger les jeunes animaux contre l'ECF. L'immunisation par la technique de l'infection et traitement semble être la méthode la plus appropriée.

Par ailleurs, l'utilisation d'un stock univalent de *T. parva* semble préférable au «Cocktail» trivalent de Muguga. En effet, il apparaît que le mélange de stocks à priori convenables pour l'immunisation peut mener à un cocktail peu efficace. Le déphasage des courbes individuelles de l'efficacité en fonction de la dose conduit à des situations dans lesquelles une des valences devient inefficace lorsqu'on tente d'optimiser une autre, les doses individuelles étant liées. De plus, sur le plan théorique, l'introduction d'une souche exogène représente un risque supplémentaire susceptible de compliquer la situation épidémiologique existante.

Ce travail démontre également que l'immunisation par la technique de l'infection et traitement en utilisant la souche Katete de *T. parva* induit un portage chronique chez les bovins. Cette propriété permet, chez la tique, aussi bien l'infection des complexes nymphes/adultes que larves/nymphes. Ces tiques furent capables d'induire des réactions cliniques sévères, voire létales, chez des animaux sensibles. Les larves s'infectent cependant nettement moins facilement que les nymphes sur les porteurs chroniques. L'existence du portage chronique et la létalité des réactions qu'il induit via transfert par le vecteur sont importantes du point de vue épidémiologique. Cela implique que l'immunisation par la méthode d'infection et traitement ne peut pas être utilisée dans une région indemne.

L'immunité maternelle ne semble pas affecter l'efficacité de l'immunisation, mais certaines données suggèrent que les anticorps maternels réduisent la séroconversion. Cette observation rendrait l'utilisation de la sérologie inadéquate à l'évaluation de la qualité de l'immunisation sur le terrain.

La chaîne de froid peut être assouplie par l'utilisation de bains de glace pour le transport des stabilats sur le terrain. En effet, sous conditions expérimentales, les stabilats

conservent 95% de leur efficacité initiale après 6 heures de conservation à 2°C. Un essai sur le terrain indique que le stabilat conservé pendant 4 à 6 heures sur de la glace est plus efficace que celui qui est décongelé extemporanément. Ceci est probablement dû au fait que l'immunisation différée permet l'utilisation de matériel plus homogène. Le transport sur glace devrait permettre une distribution moins coûteuse des stabilats de sporozoïtes, à moto ou à vélo plutôt qu'en véhicules tout terrain. En outre, l'utilisation moins onéreuse d'une formulation acide d'oxytétracycline à longue durée d'action est proposée étant donné qu'une étude en a démontré l'efficacité en tant qu'agent chimiothérapeutique lors de l'immunisation.

Trois stabilats de sporozoïtes de *T. parva* ont été lyophilisés avec succès. L'observation de schizontes et de piroplasmes chez les animaux inoculés avec ces stabilats prouve indiscutablement qu'une certaine quantité de sporozoïtes a survécu au processus de lyophilisation, même si un grand nombre d'entre eux ont sans doute été détruits. Il semblerait, par ailleurs, que la lyophilisation des stabilats permette un stockage à moyen terme plus aisé. L'inoculation de stabilat lyophilisé conservé au frigo pendant deux semaines et à -20°C pendant 12 semaines a induit, chez des animaux sensibles, des réactions cliniques et a permis l'observation du parasite au sein des tissus.

Enfin, une méthode appropriée de titrage *in vitro* des stabilats vaccinaux reposant sur le principe de l'infection *in vitro* de lymphocytes bovins et leur transformation par *T. parva* est proposée. Les contaminations par les moisissures et la fragilité des cultures de lymphocytes représentaient les principales contraintes de la méthode. Une étude a démontré que les moisissures pouvaient être éliminées des stabilats en soumettant ces derniers à une centrifugation à 400 g pendant 10 minutes. La nystatine et la flucytosine ne semblent pas interférer avec le développement *in vitro* de *T. parva* mais la rémanence de leurs propriétés fongostatiques s'est révélée insuffisante. Les titrages s'effectuent dans des plaques de 96 cupules. Les cultures sont maintenues pendant 10 jours à 37°C sous une atmosphère d'air enrichi de 5% de CO₂. La présence ou l'absence de développement parasitaire est analysée en fonction des dilutions de stabilat. Un nombre restreint de répétitions (quatre) permet une bonne quantification d'un stabilat, avec des intervalles de confiance étroits. Le titrage *in vitro* s'est avéré plus sensible que celui effectué *in vivo*.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Cette étude a confirmé la pertinence épidémiologique de l'utilisation de l'immunisation du bétail contre *Theileria parva* par la méthode d'infection et traitement en région enzootique de la Zambie de l'Est. Les veaux y sont infectés jeunes et les réactions induites sont pour la plupart aiguës voire



Distribution de stabilat de *Theileria parva* conservé sur la glace lors d'immunisation différée contre l'«East Coast fever»

létales. Sur le plan théorique, l'immunisation y est plus adéquate que le contrôle des tiques. Sur le plan pratique, elle est plus efficace que la chimiothérapie. L'immunité maternelle ne semble pas interférer avec l'immunisation des jeunes veaux mais influence la séroconversion. Il serait important de déterminer si les très jeunes animaux (moins de 2 mois) sont plus sensibles ou plus résistants à *T. parva*.

L'efficacité du cocktail Muguga est difficile à optimiser. L'utilisation de vaccins univalents est beaucoup plus simple et devrait donc être préférée là où c'est possible. L'utilisation de plusieurs vaccins univalents pourrait résoudre les difficultés relatives au cocktail lorsque l'immunisation contre plusieurs stocks est requise.

Nous avons démontré la capacité du stock Katete de *T. parva* à induire le portage chronique. Outre les conséquences épidémiologiques de cette propriété, ceci représente un inconvénient majeur de la méthode. Afin d'éviter l'introduction de souches exogènes, ce stock ne peut être utilisé là où il est absent. Les animaux immunisés ne peuvent pas non plus être déplacés. Il serait important d'approfondir les études sur l'immunité croisée afin de minimiser ces contraintes. Le portage chronique s'accompagne par ailleurs d'une immunoprotection prolongée.

L'utilisation des formulations les moins chères de tétracycline à longue durée d'action est un incontestable avantage. La découverte ou le développement de souches immunogènes de *T. parva* peu virulentes ou atténuées ne nécessitant pas de chimiothérapie ne réduirait pas significativement les coûts directs de l'immunisation. Cela permettrait cependant l'abolition des barrières géographiques imposées à l'immunisation et aux mouvements des animaux immunisés, pour autant que ces souches atténuées demeurent peu virulentes.

L'immunisation différée, permettant le transport du stabilat dans un bain de glace, a permis l'essor de la méthode dans le contexte de la privatisation des services vétérinaires en Zambie. Elle ne résout cependant pas les contraintes relatives au stockage des stabilats à moyen et à long terme.

La lyophilisation permettrait, elle, de lever ces contraintes. Nous avons démontré que les sporozoïtes de *T. parva* pouvaient survivre à la lyophilisation. Il conviendrait d'évaluer les facteurs influençant leur survie et de déterminer les paramètres optimaux relatifs à la lyoprotection, à la lyophilisation et aux conditions de stockage. L'utilisation d'un modèle simplifié pourrait faciliter cette optimisation. L'application de la lyophilisation à d'autres protozoaires tels que *Babesia* ou *Plasmodium* devrait avoir un potentiel intéressant.

La méthode de titrage *in vitro* des stabilats vaccinaux que nous avons développée devrait réduire le nombre d'animaux expérimentaux nécessaires à l'évaluation d'un nouveau stabilat. Elle devrait également permettre une estimation plus aisée des pertes de viabilité des stabilats dues aux conditions de production ou de conservation. Enfin, la virulence d'un stock ou d'un stabilat donné pourrait être estimée par la relation entre titrages *in vitro* et *in vivo*. Des améliorations de la technique sont envisageables, notamment afin d'en faciliter la lecture.

Les perspectives de vaccins modernes contre l'ECF sont, encore aujourd'hui, relativement minces. Leur prix et leur efficacité sont difficiles à prévoir. Par ailleurs, quelques améliorations techniques telles que la lyophilisation ou l'atténuation feraient de l'immunisation une méthode de contrôle de l'ECF parfaitement adaptée aux contraintes épidémiologiques et commerciales.

REMERCIEMENTS

Ce travail fut exécuté en partie à Chipata, dans la province de l'Est de la Zambie et à l'Institut de Médecine Tropicale d'Anvers entre 1993 et 2003 dans le cadre du projet ASVEZA (Assistance to the Veterinary Services of Zambia), un projet de coopération bilatérale entre la République de Zambie et le Royaume de Belgique.

PUBLICATIONS ISSUES DU TRAVAIL DE THÈSE

BILLIOUW M., MATAAL., MARCOTTY T., CHAKA G., BRANDT J., BERKVEN D. The current epidemiological status of bovine theileriosis in eastern Zambia. *Trop. Med. Int. Health*, 1999, **4**, A28-A33.

MARCOTTY T., BILLIOUW M., CHAKA G., BERKVEN D., LOSSON B., BRANDT J. Immunisation against East Coast fever by the infection and treatment method: evaluation of the use of ice baths for field delivery and appraisal of an acid formulation of long-acting tetracycline. *Vet. Parasitol.*, 2001, **99**, 175-187.

MARCOTTY T., BRANDT J., BILLIOUW M., CHAKA G., LOSSON B., BERKVEN D. Immunisation against *Theileria parva* in eastern Zambia: influence of maternal antibodies and demonstration of the carrier status. *Vet. Parasitol.*, 2002, **110**, 45-56.

MARCOTTY T., BERKVEN D., BESA R.K., LOSSON B., DOLAN T.T., MADDER M., CHAKA G., VAN DEN BOSSCHE P., BRANDT J. Lyophilisation and resuscitation of sporozoites of *Theileria parva*: preliminary experiments. *Vaccine*, in press.

MARCOTTY T., SPEYBROECK N., BERKVEN D., CHAKA G., BESA R.K., MADDER M., DOLAN T.T., LOSSON B. *In vitro* titration of *Theileria parva* tick derived stabilates. *Parasitology*, in press.