

THÈSE DE DOCTORAT EN SCIENCES VÉTÉRINAIRES

Résumé

Orientation : Médecine vétérinaire

Titre de la thèse en Français : Pathogénie des avortements à *Neospora caninum* : étude de la réponse immunitaire en relation avec l'état gestatif dans des modèles murin et ovin de néosporose congénitale

Titre de la thèse en Anglais : Pathogeny of *Neospora caninum* abortions: study of the relationship between immune response and pregnancy in murine and sheep models of congenital neosporosis

Candidat : Chantal Rettigner

Promoteur : Prof. Bertrand Losson

Co-promoteur : Prof. Jean-François Beckers

Département et Service : Département des Maladies infectieuses et parasitaires, Laboratoire de Parasitologie et de Pathologie des Maladies parasitaires, Faculté de Médecine vétérinaire, Université de Liège, Belgique

Date de la défense publique: 5 février 2004

Composition du Jury:

Membres internes à la Faculté de Médecine vétérinaire : J.-F. Beckers, F. Coignoul, P.-V. Drion, C. Hanzen, B. Losson, B. Mignon, K. Touati.

Membres externes à la Faculté de Médecine vétérinaire : B. Gottstein (Université de Bern), P. Dorny (Institut de Médecine tropicale Prince Léopold d'Anvers).

DESCRIPTION DU SUJET DE RECHERCHE ABORDÉ

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 les chiens. Au cours des années'90, *N. caninum* a été identifié comme étant un pathogène abortif majeur chez les bovins. Actuellement, l'infection par *N. caninum* a été identifiée dans de nombreux pays ; elle touche ainsi tous les continents et constitue la principale cause d'avortement en Californie, en Nouvelle-Zélande et en Hollande (Anderson *et al.*, 2000). Les femelles infectées présentent un risque d'avorter 2 à 3 fois supérieur par rapport aux animaux non infectés. En Belgique, *N. caninum* est responsable de 12 % des avortements observés chez les vaches de plus de 24 mois en Région Wallonne (De Meerschman *et al.*, 2000).

Chez les vaches infectées, la transmission verticale est très efficiente puisque 80 à 90 % des veaux nés de mères séropositives sont infectés (Schaes *et al.*, 1998). Cette transmission verticale résulte du passage transplacentaire des tachyzoïtes ; elle peut faire suite à une primo-infection de la mère au cours de la gestation ou à la réactivation de l'infection latente chez les animaux infectés de manière chronique. Cette transmission peut avoir lieu au cours de gestations successives chez une même vache mais aussi d'une génération à l'autre (Schaes *et al.*, 1998). Le mode de transmission verticale de *N. caninum* est considéré comme la voie d'infection majeure au sein des troupeaux. Le taux de séro-conversion, c'est-à-dire de nouvelles infections résultant d'une infection horizontale est, en effet, généralement assez faible dans les exploitations infectées (< 8 %/an) (Paré *et al.*, 1997 ; Hietala et Thurmond, 1999).

L'objectif de ce travail était d'améliorer les connaissances relatives à l'influence de la gestation sur la réponse immune vis-à-vis de l'infection par *N. caninum* et, plus précisément,

l'influence de cet état physiologique sur le phénomène de réactivation d'une infection chronique par cet agent pathogène. La transmission verticale de *N. caninum*, de la vache infectée à son fœtus, au cours de la gestation est en effet considérée comme la voie de contamination la plus importante. En effet, si l'ingestion des oocystes excrétés par le chien est à l'origine de l'introduction de l'infection dans un troupeau indemne, la transmission verticale assure, quant à elle, la persistance du parasite au sein de l'exploitation.

La période de gestation s'accompagne de la mise en place d'un microenvironnement immunitaire particulier au niveau de l'interface fœto-placentaire. Ces modifications locales du système immunitaire ont également des répercussions systémiques qui altèrent la capacité à mettre en place une réponse immune à médiation cellulaire (Krishnan *et al.*, 1996). Le phénomène de réactivation de l'infection latente par *N. caninum* pourrait donc, dans cette optique, être lié à l'état gestatif qui favorise une orientation de type Th2 de la réponse immunitaire.

RÉSULTATS

La première étape de notre travail a consisté dans la mise au point (étude 1) et l'utilisation (étude 2) d'un modèle expérimental murin de néosporose congénitale et ceci afin d'identifier les différents facteurs responsables, ou tout du moins accompagnant, la réactivation de l'infection chronique chez les animaux gestants. Au cours de la première étude, une lignée de souris consanguine (CBA/Ca) et une lignée non consanguine (*Swiss white*), ayant reçu 3 doses différentes de tachyzoïtes de la souche NC-1, ont été utilisées. Afin de mimer la pathogénie de l'infection observée chez les bovins, les animaux infectés devaient développer une infection latente (présence de bradyzoïtes intrakystiques) mais devaient également se montrer résistants vis-à-vis de l'infection. Les résultats ont montré que seules les souris CBA/Ca ayant reçu les 2 doses les plus élevées de tachyzoïtes avaient développé des kystes cérébraux, ceux-ci n'ayant été observés qu'après 10 semaines d'infection. Dans une deuxième expérience, nous avons montré que toutes les souris développaient une réponse lymphoproliférative spécifique élevée accompagnée de la production de taux importants d'IFN (cytokine de type Th1). La synthèse de cytokines IL-4 et IL-10 a également été observée, et ce essentiellement chez les souris CBA/Ca. Cette production de cytokines Th2 n'était pas accompagnée d'une augmentation de la susceptibilité des animaux vis-à-vis de l'infection. Au vu de ces résultats, nous avons donc utilisé par la suite les souris CBA/Ca recevant 5×10^6 tachyzoïtes.

Dans la deuxième étude, ce modèle murin a été utilisé afin de suivre la réponse immune spécifique accompagnant la réactivation de l'infection chronique au cours de la gestation. La transmission verticale du parasite a été démontrée chez les souris infectées de manière chronique au cours de leur première gestation mais ce taux a chuté après 2 et 3 gestations

successives. Avant leur fécondation, les souris infectées de manière chronique présentaient une réponse proliférative élevée accompagnée de la sécrétion préférentielle d'IgG2a. Au cours de la première gestation, aucune modification significative de la réponse lymphoproliférative et des taux d'IgG1 et IgG2a spécifiques, des populations de cellules CD4+ et CD8+ ou encore de l'expression des ARNm pour les cytokines IFN- γ , IL-4 et IL-10 n'a été observée. Après 2 gestations successives, la réponse lymphoproliférative spécifique a montré une chute significative accompagnée de l'expression de l'ARNm pour l'IL-4 et l'IL-10. Au même moment la production d'IgG1 a augmenté jusqu'à égaler celle d'IgG2a. Les souris infectées au cours de leur gestation ont été incapables de développer une réponse lymphoproliférative spécifique jusqu'au 11^e jour après l'infection au contraire des souris non gestantes. Ces souris présentaient également des lésions anatomo-pathologiques moins inflammatoires et moins étendues que les souris non gestantes.

Afin de confirmer les résultats obtenus jusqu'à présent, un modèle expérimental ovin a été développé (étude 3). La réactivation de l'infection latente n'ayant, jusqu'à présent, jamais été observée chez les bovins dans des conditions expérimentales. L'utilisation du mouton, qui développe une pathogénie identique à celle observée chez les bovins et donne lieu à la réactivation de l'infection chronique au cours de la gestation, constitue donc un modèle expérimental alternatif de choix. Au cours de cette étude, les brebis ont développé une réponse cellulaire et humorale dans les 2 semaines qui ont suivi l'inoculation. Le niveau de la réponse lymphoproliférative a montré une grande variation entre les animaux. Une phase d'immunodépression a été observée au jour 21 PI. Le suivi de la réponse humorale par une technique d'immunoblotting a montré que les protéines parasitaires de 44, 42, 40, 39 et 28 kDa étaient reconnues de manière intense par tous les animaux. Néanmoins l'intensité du signal a montré une diminution 8 semaines après l'infection. Plusieurs protéines (59, 54 et 38-37 kDa) ont été reconnues par un grand nombre d'animaux infectés au cours des premières semaines de l'infection mais, à la fin de l'expérience, plus aucun signal n'était observé.

Dans la dernière étude (étude 4) l'influence de la gestation sur la réponse immune vis-à-vis du parasite a été étudiée chez des brebis infectées de manière chronique et chez des brebis infectées de manière aiguë (à 90 jours de gestation). Nous avons observé que les brebis infectées de manière chronique, examinées 7 à 8 mois après leur infection, ne présentaient plus de réponse lymphoproliférative spécifique. Néanmoins, la réponse cellulaire spécifique est réapparue au cours de la première moitié de la gestation chez tous ces animaux. Cette réponse a, par la suite, été variable mais la majorité des animaux ont présenté une réponse significative soutenue au cours des semaines 10 à 16 de la gestation. Au cours de cette période, les antigènes de poids moléculaires de 38-37 et 27 kDa ont été reconnus par un nombre plus élevé d'animaux. Les taux d'IgG spécifiques sont, eux, restés stables tout au long de la gestation. Les brebis



La réactivation d'une infection latente par *Neospora caninum* au cours de la gestation peut conduire à un avortement.

infectées de manière chronique ont reconnus de manière intense les protéines parasitaires de 49, 44, 42, 39, 28 et 25 kDa tout au long de la période expérimentale.

Les brebis infectées au cours de leur gestation ont, quant à elles, développé une réponse cellulaire une semaine après l'infection alors que la réponse humorale est apparue dans les 3 semaines après l'inoculation. De nombreuses protéines parasitaires ont été reconnues par ces animaux ; les antigènes de 28 et 25 kDa ont été reconnus le plus intensément.

La transmission verticale a été observée chez toutes les brebis infectées de manière chronique et chez certaines des brebis infectées de manière aiguë. La mise en évidence d'ADN parasite au sein du fœtus n'a pas toujours été accompagnée de la présence d'une réponse immune spécifique fœtale et vice-versa. Aucun avortement et aucune lésion anatomopathologique n'ont été observés chez les brebis infectées.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Le but principal de ce travail était d'améliorer les connaissances relatives à l'influence de la gestation sur la réponse immune vis-à-vis de *N. caninum* et la réactivation de l'infection chronique par ce même protozoaire.

Dans une première étude, l'importance du choix de la lignée murine ainsi que de la dose infectante a été démontrée dans le cadre de la mise au point d'un modèle expérimental murin d'infection latente par *N. caninum*.

L'étude de la réponse immune spécifique chez les souris gestantes infectées de manière chronique a démontré qu'aucune modification significative de la réponse immune systémique ne survenait au cours de la première gestation des animaux alors que la transmission verticale du parasite était observée. Ces résultats semblent montrer que la réactivation de l'infection chronique par *N. caninum* n'est pas induite par une altération de la réponse immune systémique. Néanmoins, certains des résultats obtenus montrent l'existence d'une influence de la gestation sur la réponse immune spécifique mais suggèrent que cette influence nécessite une imprégnation prolongée du système immunitaire par le climat gestatif.

Les brebis infectées de manière chronique montrent, quant à elles, que la réponse cellulaire spécifique, mise en place rapidement après l'inoculation, disparaît après plusieurs mois d'infection. Aucune modification de la réponse lymphoproliférative vis-à-vis de la concanavaline A n'a été observée au cours de l'expérience. La réponse cellulaire spécifique réapparaît entre les semaines 5 et 11 de la gestation chez tous les animaux. Au cours de la même période, un accroissement de la fréquence de reconnaissance des antigènes de 38-37 et 27 kDa a été observé. La reconnaissance de ces antigènes disparaissait rapidement au cours de la primo-infection. Ces antigènes semblent donc liés à la phase de multiplication active de *N. caninum*. Ces résultats ainsi que la mise en évidence de l'existence d'une transmission verticale de l'infection semblent indiquer que la réactivation de l'infection latente a lieu au cours de la première moitié de la gestation chez la brebis.

En conclusion, notre travail a permis d'améliorer les connaissances relatives à l'influence de la gestation sur la réactivation de l'infection chronique par *N. caninum*. En effet, l'absence d'altération de la réponse immune spécifique au niveau systémique au cours de la réactivation de l'infection chronique chez les souris CBA/Ca gestantes a été démontrée. Néanmoins, une interaction entre la durée d'imprégnation du système immunitaire par le climat gestatif et l'apparition de modifications significatives de la réponse immune a également été suggérée. Chez les brebis infectées de manière chronique, l'absence de modification significative du taux de prolifération vis-à-vis de la Con A ainsi que la disparition de la réponse cellulaire spécifique avant la période de la gestation semblent également indiquer que la gestation n'entraîne pas d'altération de la réponse immune systémique et que la réactivation de l'infection latente n'est pas provoquée par une chute de la réponse cellulaire spécifique systémique.

La gestation ne provoquerait pas activement la rupture de kystes à bradyzoïtes ; celle-ci, survenant de manière fortuite, libérerait régulièrement des tachyzoïtes qui en dehors de la période de gestation seraient rapidement éliminés par la réponse immune de l'animal. Néanmoins, au cours de la gestation, les tachyzoïtes gagnant rapidement l'utérus par voie sanguine y trouveraient alors un environnement adapté à leur multiplication et à leur survie. Dans cette optique, l'effet protecteur de la réponse humorale, qui agirait alors en limitant la dissémination parasite au cours de cette étape extracellulaire, devrait être précisé. Le rôle des antigènes parasitaires de 38-37 et 27 kDa devrait être précisé afin de vérifier leur intérêt dans le développement d'une stratégie vaccinale ou thérapeutique.

Additionnellement, la gestation pourrait altérer directement la réponse immune spécifique locale mise en place au niveau du SNC, réponse qui vise à maintenir l'infection sous forme latente, et cela sans induire de modifications significatives de la réponse immune systémique. Il serait intéressant d'étudier plus précisément la réponse immune locale et son évolution au cours de la gestation en utilisant par exemple le modèle murin développé au cours de ce travail.

REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier le Fonds pour la Formation à la Recherche dans l'Industrie et l'Agriculture (F.R.I.A.) pour l'octroi de deux mandats de deux ans. Le Ministère des Classes Moyennes et de l'Agriculture, le Fonds pour la Recherche

Scientifique et Médicale, le Fonds National de la Recherche Scientifique (F.N.R.S.) et le Patrimoine de l'Université de Liège qui ont contribué à financer les recherches et la participation à différentes manifestations scientifiques internationales sont également remerciés.

RÉFÉRENCES

- ANDERSON M.L., ANDRIANARIVO A.G., CONRAD P.A. Neosporosis in cattle. *Anim. Reprod. Sc.*, 2000, **60-61**, 417-431.
- DE MEERSCHMAN F., FOCANT C., BOREUX R., LECLIPTEUX T., LOSSON B. Cattle neosporosis in Belgium : a case-control study in dairy and beef cattle. *Int. J. Parasitol.*, 2000, **30**, 887-890.
- HIETALA S.K., THURMOND M.C. Postnatal *Neospora caninum* transmission and transient serologic responses in two dairies. *Int. J. Parasitol.*, 1999, **29**, 1669-1676.
- KRISHNAN L., GUILBERT L.J., RUSSELL A.S., WEGMANN T.G., MOSMANN T.R., BELOSEVIC M. Pregnancy impairs resistance of C57BL/6 mice to *Leishmania major* infection and causes decreased antigen-specific IFN- responses and increased production of T helper 2 cytokines. *J. Immunol.*, 1996, **156**, 644-652.
- 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.
- SCHARES G., PETERS M., WURM R., BÄRWALD 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.

PUBLICATIONS ISSUES DU TRAVAIL DE THÈSE

- 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**, 225-232.
- RETTIGNER C., LOSSON B. INTERACTIONS ENTRE LA RÉPONSE IMMUNE ET LA GESTATION. *AN. MED. VET.*, SOUMIS POUR PUBLICATION.
- RETTIGNER C., DE MEERSCHMAN F., FOCANT C., VANDERPLASSCHEN A., LOSSON B. The vertical transmission following the reactivation of a *Neospora caninum* chronic infection does not seem to be due to an alteration of the systemic immune response in pregnant CBA/Ca mice. *Parasitology*, 2004, **128**, 149-160.
- RETTIGNER C., LASRIS., DE MEERSCHMAN F., FOCANT C., BECKERS J.-F., LOSSON B. Immune response and antigen recognition in non-pregnant ewes experimentally infected with *Neospora caninum* tachyzoites. *Vet. Parasitol.*, 2004, **122**, 261-271.
- RETTIGNER C., DE MEERSCHMAN F., FOCANT C., LOSSON B. The reactivation of *Neospora caninum* chronic infection in pregnant mice. In : Proceedings of the XIX Conference of the World Association of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology, New-Orleans, 10-14 août 2003, 169.
- RETTIGNER C., LECLIPTEUX T., DE MEERSCHMAN F., FOCANT C., LOSSON B. Development of a murine model of congenital neosporosis. In : Proceedings of the 2001 meeting of the Belgian Society for Parasitology. Presses de la Faculté de Médecine vétérinaire de l'Université de Liège : Liège, 22.
- RETTIGNER C., LECLIPTEUX T., DE MEERSCHMAN F., FOCANT C., LOSSON B. Development of a murine model of congenital neosporosis. In : Proceedings of the Conference Neospora 2001, Moredun Institute Edinburgh, Scotland, 13-15 septembre 2001, 29.
- RETTIGNER C., LECLIPTEUX T., FOCANT C., LOSSON B. Development of a murine model of congenital neosporosis. In : Proceedings of the 18th International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology, 26-30 August 2001, Stresa, Italie, 20.