

Études immunologiques sur les trypanosomoses

III. Essais d'immunisation de moutons contre l'infection cyclique par *Trypanosoma congolense*

par G. UILENBERG (*) et M. GIRET (**)

RESUME

L'inoculation de trypanosomes du « type de base » d'une souche de *Trypanosoma congolense*, suivie par un traitement stérilisant, ne protège pas les moutons contre une infection cyclique par la même souche.

Une infection cyclique, éliminée par un traitement, peut protéger les moutons contre des infections cycliques suivantes par la même souche, mais cela n'est pas toujours le cas et dépend peut-être du taux d'anticorps contre le « type de base », qui est fonction du temps écoulé depuis la première infection cyclique; les échecs peuvent également être dus au fait que le « type de base » n'est pas stable.

INTRODUCTION

En nous basant sur les résultats de nos premières recherches sur le type antigénique de base d'une souche de *Trypanosoma congolense* (3, 4), nous avons espéré pouvoir utiliser ce type de base pour immuniser des moutons contre l'infection cyclique. Bien que plus tard, il ait été démontré qu'il n'existe pas un type de base aussi stable qu'on pouvait l'espérer au début (5), nous exposerons ici les résultats des quelques essais d'immunisation effectués, dont nous pensons qu'ils pourront apporter quelques données nouvelles.

MATERIEL ET METHODES

Ils ont été exposés auparavant (3). Nous ne donnerons pas tous les détails des tests de

neutralisation effectués lors des recherches présentes.

RECHERCHES ET RESULTATS

I. Essais d'immunisation contre l'infection cyclique à l'aide du type de base

a) Un mouton neuf (M 10) a été inoculé par voie sous-cutanée avec environ 70.000 trypanosomes du type de base de la souche EATRO 325-I (voir 5) (*).

La parasitémie de M 10 est devenue apparente 13 jours après l'inoculation des trypanosomes, mais elle est restée faible et n'a pas été accompagnée d'hyperthermie jusqu'à l'élimination de l'infection par une dose élevée d'acéturate de diminazine (Berenil, N.D.) (10 mg/kg), 3 semaines après l'infection.

Il n'y a pas eu d'apparition d'anticorps contre le stabilat inoculé, décelables par le test

Institut d'Elevage et de Médecine vétérinaire des Pays tropicaux, 10, rue Pierre Curie, 94700 Maisons-Alfort, France.

(*) Adresse actuelle: F.A.O. Tick Project. P.O. Box 24, Entebbe, Uganda.

(**) Adresse actuelle: Service de l'Elevage. Projet Togo I.E.M.V.T., Dapango, Togo.

(*) Les trypanosomes de ce type avaient été obtenus par l'inoculation à des souris du sang du mouton M 4 pendant son accès latent, 8 jours après son infection cyclique (voir 3, p. 48); ils avaient été conservés dans de l'azote liquide.

de neutralisation. Notons que le type antigénique obtenu de M 10, 6 jours après l'inoculation des trypanosomes, s'est montré être déjà un variant du type de base inoculé.

M 10 a été éprouvé 2 mois après l'injection des trypanosomes par une infection cyclique de la même souche, utilisant des *Glossina m. morsitans* (*) nourries un mois auparavant à travers une membrane *in vitro* sur du sang de souris infectées avec un mélange de variants antigéniques de la souche EATRO 325-I (**); M 10 s'est infecté comme un animal neuf et l'évolution de l'infection a été tout à fait normale.

Le type antigénique obtenu pendant son accès latent n'était pas le même que celui des accès latents de M 1 à M 6, bien qu'il y fût apparenté (voir « Discussion »). L'infection a été éliminée par le Berenil, 23 jours après l'épreuve cyclique. Cette fois-ci, des anticorps neutralisants sont bien apparus, à un taux élevé contre le type de son propre accès latent, plus faible contre celui des accès latents de M 1 à M 6.

Ajoutons l'observation suivante :

Six mois après cette infection cyclique, le sérum de M 10 possédait encore une certaine activité neutralisante contre le type de l'accès latent de M 3 (neutralisation partielle). Le mouton M 10 a alors été inoculé par voie intraveineuse avec environ 1 million de trypanosomes du type de l'accès latent de M 3. Du sang de M 10 a été prélevé et inoculé à des souris 10 mn après l'injection, de nouveau 3 h 30 après l'injection, après 24 heures et ensuite à intervalles de quelques jours pendant plus d'un mois. Le sang était infectieux pour la souris après 10 mn et 3 h 30 (**), mais non par la suite. Malgré le fait que le sérum de M 10 ne neutralisait le type injecté que partiellement, l'immunité du mouton était donc assez forte pour le protéger contre l'épreuve par voie intraveineuse par 1 million de trypanosomes de ce type. Les types obtenus après 10 mn et 3 h 30 ne pouvaient pas être distingués du type

injecté, ce qui montre que la variation antigénique en présence d'anticorps n'est pas toujours aussi rapide que certains l'ont pensé (1, 2). La neutralisation *in vivo* semble d'ailleurs avoir été moins rapide qu'*in vitro* : nous avons calculé qu'un ml de sang du mouton pouvait contenir au plus 500 trypanosomes tout de suite après l'injection en intraveineuse, tandis que 0,1 ml de mélange du stabilat et de sérum dans le test de neutralisation en contenait au moins 5.000. Néanmoins, l'incubation parasitaire chez la souris après l'injection de 1 ml de sang du mouton 10 mn et 3 h 30 après son infection, était suivie d'une incubation de seulement 4 à 5 jours, tandis que l'incubation la plus courte chez une des souris inoculées avec 0,1 ml du mélange après un test de neutralisation, utilisant le même stabilat et du sérum du mouton prélevé peu avant cette épreuve par voie intraveineuse, était de 8 jours (neutralisation partielle).

b) Un mouton neuf (M 11) a été inoculé par voie sous-cutanée avec environ 100.000 trypanosomes du type de base de la souche EATRO 325-I (****) et de nouveau 3 semaines plus tard, avec le même nombre et le même type, mais cette fois-ci par voie intraveineuse. Un autre mouton (M 12) a été inoculé de la même façon, mais les deux fois avec environ 1,5 million de trypanosomes du type de base (*****).

Le sang de M 11 n'est devenu infectieux pour la souris qu'après la deuxième inoculation (par voie intraveineuse); celui de M 12 n'était pas infectieux 11 jours après la première injection (par voie sous-cutanée), mais il l'était 3 jours plus tard et le type antigénique obtenu à ce moment semblait encore être le même que celui inoculé. La parasitémie du M 11 n'est devenue apparente pour la première fois que 15 jours après la deuxième injection (en intraveineuse) et du M 12 que 5 jours après la deuxième injection; elle est devenue importante chez les deux sujets.

L'infection de M 11 a été éliminée par le Berenil 2 mois après la première injection de trypanosomes, celle de M 12 après 1 mois.

(*) Comme toutes les glossines utilisées, elles proviennent de l'élevage du Dr J. Itard de notre Institut.

(**) Obtenus des moutons M 1, M 2, M 3, M 4 et M 5 de 2 à 6 semaines après leur infection cyclique.

(***) Avec une incubation chez la souris de 4 à 5 jours.

(****) Obtenus du mouton M 2 pendant son accès latent, 7 jours après son infection cyclique.

(*****) Obtenus du mouton M 3 pendant son accès latent, 6 jours après son infection cyclique.

Des anticorps neutralisants contre le type de base injecté ont fait leur apparition chez les deux animaux. Trois mois après l'infection, leur taux était élevé chez le mouton M 12, celui qui avait reçu le plus grand nombre de trypanosomes (neutralisation complète, même d'un stabilat contenant 15 millions de trypanosomes par ml); le taux était plus bas chez le M 11 (neutralisation complète d'un stabilat « normal » contenant environ 1 million de trypanosomes par ml (voir 3), neutralisation partielle d'un stabilat de 15 millions de trypanosomes par ml).

M 11 et M 12 ont alors été éprouvés par une infection cyclique de la même souche, utilisant les mêmes lots de *G. morsitans* ayant infecté le mouton M 10 (voir plus haut). Tous les deux se sont infectés comme des animaux neufs. L'évolution a été tout à fait normale chez le M 12, celui possédant le taux le plus élevé d'anticorps; elle n'a été anormale chez le M 11 que par le fait que la parasitémie n'est devenue apparente qu'un mois après l'infection (*), mais l'apparition des trypanosomes au microscope a été précédée par une longue période de parasitémie latente et des périodes d'hyperthermie.

Le type antigénique de l'accès latent de M 12 était apparenté au type de base inoculé, mais non identique à celui-ci. Le premier type de l'accès latent de M 11 n'a pas pu être différencié du type de base inoculé, mais le type avait déjà changé le lendemain, contrairement à ce que nous avons observé chez des moutons neufs (**) (voir « Discussion »).

II. Protection conférée par une infection cyclique contre une infection cyclique suivante par la même souche

a) Comme nous l'avons exposé auparavant, une infection cyclique par la souche EATRO 325-I, éliminée par le Berenil après 3 semaines, n'a pas du tout protégé contre une infection cyclique par la souche 325-II, 50 jours après le traitement stérilisant (voir 5, mouton M 6).

(*) Une telle évolution n'est d'ailleurs pas nécessairement anormale, étant donné que nous l'avons observée chez un mouton neuf également (voir 3, la description de l'évolution de M 9).

(**) Par exemple, le premier type obtenu du mouton M 3, 6 jours après son infection cyclique, n'a pas pu être différencié du type obtenu 5 jours plus tard.

Pourtant le sérum de M 6, prélevé 39 jours avant cette deuxième infection, neutralisait complètement le type de l'accès latent de 325-II chez ce mouton (voir 5, tableau III); ajoutons qu'un sérum pris 8 jours avant l'infection par 325-II ne neutralisait plus que partiellement le type de base de 325-I, mais ce sérum n'a malheureusement pas été testé contre la souche 325-II.

L'infection par EATRO 325-II a été éliminée par le Berenil après 22 jours. Le mouton M 6 a ensuite éprouvé, avec des glossines infectées par 325-II, à 4 reprises, 9, 11, 14 et 15 semaines après l'infection par 325-II (donc 6, 8, 11 et 12 semaines après l'élimination par le Berenil) (voir tableau I).

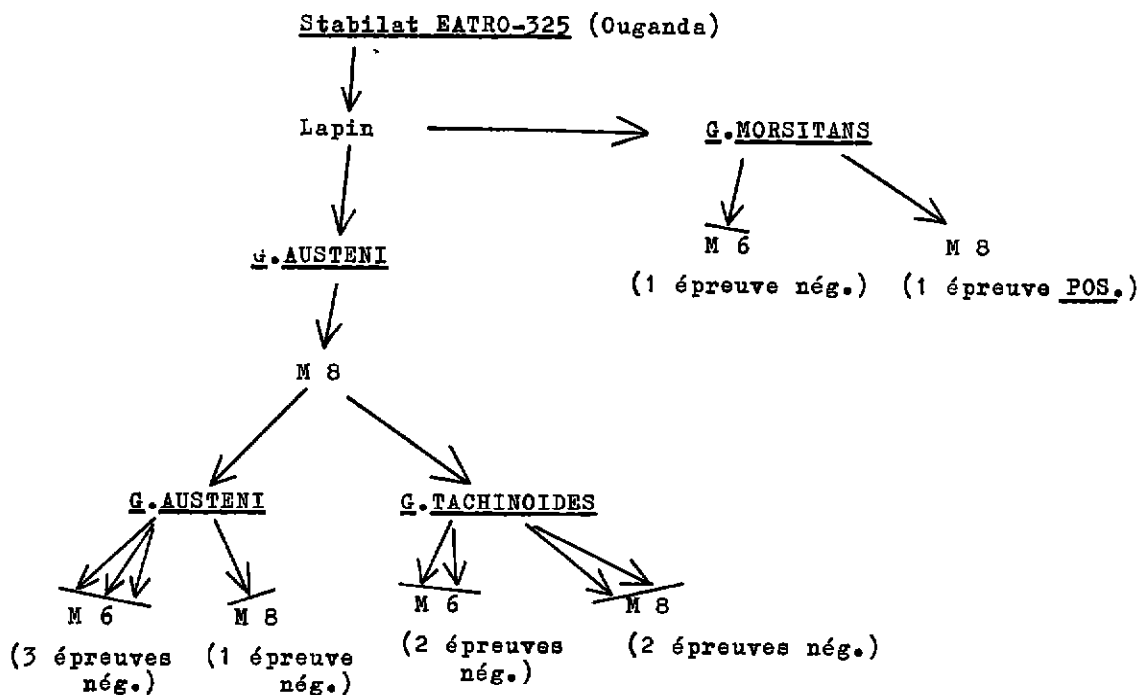
Les glossines utilisées pour les épreuves étaient des *G. austeni*, *G. tachinoides* et *G.m. morsitans* (♂♂ et ♀♀). Les *G. austeni* et *G. tachinoides* avaient été infectées sur un lapin inoculé avec un stabilat du mouton M 8, obtenu lors de sa première parasitémie apparente après l'infection cyclique par 325-II (voir 5). Les *G. morsitans* avaient été exposées à l'infection sur un lapin, porteur chronique de la souche 325-II, infecté 3 mois plus tôt par l'inoculation d'un capillaire du stabilat EATRO 325, reçu en 1971 de l'EATRO (ce même lapin avait alors servi à infecter les glossines utilisées pour transmettre cette souche aux moutons M 6, M 7 et M 8) (voir 5).

La première épreuve du M 6 a été faite avec les *G. austeni* et *G. tachinoides*, 30 jours après leur premier repas sur le lapin infecté (pris lors de la première apparition des trypanosomes chez celui-ci); il y avait alors plus de 300 *G. austeni* et plus de 200 *G. tachinoides*. Pour la deuxième épreuve, seulement les *G. austeni* (environ 250) ont été utilisées. La troisième épreuve a été faite avec les deux espèces; il ne restait alors que 105 *G. austeni* et 35 *G. tachinoides*. La quatrième épreuve a eu lieu avec les *G. morsitans*, un mois et demi après leur premier repas sur le lapin porteur; il y avait alors environ 100 mouches. 4 sur 43 *G. austeni* disséquées ont montré une infection de la trompe, 4 sur 39 *G. tachinoides* et 10 sur 98 *G. morsitans*.

Toutes les espèces se sont révélées infectieuses par le fait qu'après un repas sur du sang *in vitro*, à travers une membrane, ce sang était infectieux pour des souris; le lot de *G. morsi-*

TABLEAU N° I

Schéma des épreuves cycliques des moutons M 6 et M 8



tans s'est en outre montré infectieux par l'infection du mouton M 8 (voir ci-dessous). Ajoutons que nous avons toujours laissé jeûner les mouches pendant au moins 48 heures avant chaque épreuve.

Le mouton M 6 ne s'est pas infecté, ce qui a été contrôlé par l'examen de gouttes épaisses, la prise de la température et l'inoculation régulière de son sang à des souris, jusqu'à 35 jours après la quatrième épreuve.

Ajoutons que le sérum de M 6, prélevé 22 jours après son infection par 325-II, soit 41 jours avant la première épreuve, neutralisait complètement aussi bien le type de base de 325-I que les types des accès latents de M 6, M 7, M 8 et M 9 après leur infection par 325-II (voir 5). Le sérum de M 6, 23 jours avant la première épreuve, neutralisait complètement le type de son propre accès latent après l'infection par 325-II, mais il n'a pas été testé contre des stabilats des autres moutons.

b) Un mouton neuf, M 8, a été infecté cycliquement par la souche 325-II (voir 5). L'infection a été éliminée par le Berenil après 27 jours. Un mois plus tard, son sérum neutralisait encore complètement le type de son accès

latent, mais le taux avait baissé 2 mois après le traitement (neutralisation encore complète dans le test « normal », partielle avec du sérum dilué au 1/10, tandis que le sérum prélevé un mois après le traitement neutralisait complètement, même dilué).

Le mouton M 8 a été éprouvé avec des glossines infectées par 325-II, à 3 reprises : 9, 11 et 14 semaines après l'infection (soit 5, 7 et 10 semaines après le traitement stérilisant).

Les lots de glossines utilisées étaient les mêmes que ceux employés pour les épreuves du mouton M 6. La première épreuve a été faite avec les *G. austeni* et *G. tachinoides* (respectivement plus de 300 et plus de 200), la deuxième seulement avec les *G. tachinoides* (environ 150), la troisième avec les *G. morsitans* (environ 120) (voir le tableau I).

Le mouton M 8 s'est infecté. Son sang a été régulièrement inoculé à des souris, des gouttes épaisses ont été examinées quotidiennement, et la température prise. Son sang est devenu infectieux entre 7 et 14 jours après la dernière épreuve, et la parasitémie apparente, accompagnée d'une hyperthermie a commencé 16 jours après cette épreuve. Etant donné ce que nous

connaissions de l'évolution des infections cycliques chez les moutons (3, 5), il est certain que c'est la dernière épreuve qui l'a infecté.

Un stabilat n'a pas pu être fait du type de l'accès latent. Un lot de *G. morsitans* a été nourri sur ce mouton lors de la première parasitémie apparente, et a transmis l'infection plus tard au mouton M 9 (voir 5). Le sérum de M 8, prélevé 24 jours après sa première infection par la souche 325-II, neutralisait complètement le type de l'accès latent de M 9, mais le sérum pris 97 jours après la première infection de M 8, soit le jour de sa troisième épreuve, ne le faisait plus que partiellement.

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

L'inoculation de formes sanguines du « type de base », suivie par un traitement stérilisant, n'a pas protégé les moutons contre l'infection cyclique par la même souche. Maintenant que nous savons qu'il n'y a pas de « type de base » très stable (5), cela n'est pas étonnant. Le fait que les types des accès latents des moutons éprouvés ne sont pas toujours identiques au

« type de base » (M 10 et M 12) peut être expliqué aussi bien par le fait qu'il n'y a pas de « type de base » très stable, que par la présence d'anticorps, provoquée par l'injection des formes sanguines, causant une variation précoce, et cette dernière hypothèse est renforcée par la variation précoce observée pendant l'accès latent du M 11.

Une infection cyclique, éliminée par un traitement, peut conférer une immunité contre des infections cycliques suivantes par la même souche (M 6, M 8), mais cela n'est pas toujours vrai (M 8). L'infection du M 8 par la troisième épreuve peut être due à une variation du « type de base » (le type de l'accès latent de M 9 n'est pas identique à ceux des accès latents de M 7 et M 8, voir 5), mais également au fait que le taux d'anticorps chez le M 8 avait baissé au moment de l'épreuve.

De nombreuses recherches seront encore nécessaires pour élucider toutes les questions qui se posent au sujet des variations antigéniques en particulier, et l'immunologie en général, dans les trypanosomes, si peu connues encore. Il semble inutile pour l'instant de spéculer sur des bases étroites.

SUMMARY

Immunological studies on trypanosomiasis III. Immunization trials of sheep against cyclical infection by *Trypanosoma congolense*

The inoculation of trypanosomes of the « basic type » of a strain of *Trypanosoma congolense*, followed by a sterilizing treatment, does not protect sheep against a subsequent cyclical infection with the same strain.

A cyclical infection, eliminated by treatment, can protect sheep against subsequent cyclical infections with the same strain, but that is not always true, and depends perhaps on the level of antibodies against the "basic strain type", which may decrease with time after the first cyclical infection; failure can also be due to the fact that the "basic strain type" is not stable.

RESUMEN

Estudios inmunológicos sobre las tripanosomiasis III. Ensayos de inmunización de ovejas contra la infección ciclica por *Trypanosoma congolense*

La inoculación de tripanosomas del « tipo de base » de una cepa de *Trypanosoma congolense*, seguida por un tratamiento esterilizante, no protege las ovejas contra una infección ciclica por la misma cepa.

Una infección ciclica, eliminada por un tratamiento, puede proteger las ovejas contra infecciones ciclicas siguientes por la misma cepa, pero eso no es siempre el caso y depende acaso de la tasa de anticuerpos contra el « tipo de base », que es función del tiempo pasado desde la primera infección ciclica; la inestabilidad del tipo de base igualmente puede ser causa de los fracasos.

BIBLIOGRAPHIE

1. INOKI (S.). A new experimental method and genetical interpretation on the antigenic variation in *Trypanosoma gambiense*. *Med. J. Osaka Univ.*, 1952, **3** : 81-86.
2. INOKI (S.), OSAKI (H.) et NAKABAYASHI (T.). Studies on the immunological variation in *Trypanosoma gambiense*. II. Verifications of the new variation system by Ehrlich's and *in vitro* methods. *Med. J. Osaka Univ.*, 1956, **7** : 165-173.
3. UILENBERG (G.) et GIRET (M.). Etudes immunologiques sur les trypanosomes. I. Existence d'un type antigénique de base chez une souche de *Trypanosoma congolense* Broden, 1904 - Variations après transmission cyclique. *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1972, **25** : 37-52.
4. UILENBERG (G.) et GIRET (M.). Antigenic types of a strain of *Trypanosoma congolense* after cyclical transmission. *Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg.*, 1972, **66** : 343-344.
5. UILENBERG (G.), MAILLOT (L.) et GIRET (M.). Etudes immunologiques sur les trypanosomes. II. Observations nouvelles sur le type antigénique de base d'une souche de *Trypanosoma congolense*. *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1973, **26** (1).