

N° d'ordre : 2328

## THESE

présentée

pour obtenir

**LE TITRE DE DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE  
TOULOUSE**

École doctorale : Sciences Ecologiques, Vétérinaires,  
Agronomiques et Bioingénieries

Spécialité : Sciences agronomiques

Par Mr Mohamed GHARBI

Titre de la thèse

**Vaccination contre la theilériose tropicale en Tunisie  
(*Theileria annulata*) : analyse économique et essai  
d'immunisation par ADN**

Soutenu le 09 mars 2006 devant le jury composé de :

M.	Alain MILON	Président
MM.	Emmanuel CAMUS	Rapporteur
	Henri-Jean BOULOUIS	Rapporteur
	Philippe DORCHIES	Directeur de thèse
	Mohamed KILANI	Membre
	Mohamed Aziz DARGHOUTH	Membre

N° d'ordre : 2328

# THESE

présentée

pour obtenir

**LE TITRE DE DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE  
TOULOUSE**

École doctorale : Sciences Ecologiques, Vétérinaires,  
Agronomiques et Bioingénieries

Spécialité : Sciences agronomiques

Par Mr Mohamed GHARBI

Titre de la thèse     **Vaccination contre la theilériose tropicale en Tunisie**  
**(*Theileria annulata*) : analyse économique et essai**  
**d'immunisation par ADN**

Soutenue le 09 mars 2006 devant le jury composé de :

M.	Alain MILON	Président
MM.	Emmanuel CAMUS	Rapporteur
	Henri-Jean BOULOUIS	Rapporteur
	Philippe DORCHIES	Directeur de thèse
	Mohamed KILANI	Membre
	Mohamed Aziz DARGHOUTH	Membre

Le travail présent a été réalisé au Laboratoire de Parasitologie de l'Ecole Nationale de Médecine Vétérinaire de Sidi Thabet sous la direction scientifique du Professeur Mohamed Aziz Darghouth. Il a été financé par le Laboratoire d'Epidémiologie des Maladies Infectieuses, Parasitaires et Zoonotiques (Ministère de la Recherche Scientifique et de la Promotion des Compétences, Tunisie), l'Institution de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur Agricoles (Ministère de l'Agriculture et des Ressources Hydrauliques, Tunisie) et le projet TANVAC (contrat ICA4 – CT – 2000-30020), financé par l'Union Européenne.

La préparation des antigènes recombinants a été réalisée à l'Institut de Médecine Comparative (Glasgow University Veterinary School), le Département de Biology (Université de York), le Wellcome Trust Centre for Human Genetics (Oxford) et l'Institute of Infectious Diseases and Immunology (University of Utrecht).

# Remerciements

***A Monsieur le Professeur Alain Milon,***

Je vous remercie pour l'honneur que vous me faites en acceptant de juger ce travail. J'ai toujours admiré l'ampleur de vos connaissances, votre modestie et vos qualités humaines.

Veillez trouver ici, le témoignage de mon admiration et de mon respect.

***A mon Directeur de thèse, le Professeur Philippe Dorchies,***

Je tiens à vous exprimer mes remerciements les plus sincères pour m'avoir choisi et confié ce travail. Votre aide scientifique inestimable, votre soutien moral durant les moments difficiles, votre compréhension et votre gentillesse m'ont beaucoup marqué. J'espère que ce travail témoigne de ma profonde reconnaissance et de ma haute considération.

***A Monsieur le Professeur Jean-Henri Boulouis,***

Vous me faites un grand honneur en acceptant de juger ce travail. Vos qualités humaines et professionnelles sont un modèle à suivre.

Veillez trouver ici, le témoignage de ma reconnaissance et de mon profond respect.

***A Monsieur le Professeur Emmanuel Camus,***

Vous me faites un grand honneur en acceptant de juger ce travail. Vos qualités humaines et professionnelles sont un modèle à suivre.

Veillez trouver ici, le témoignage de ma reconnaissance et de mon profond respect.

***A Monsieur le Professeur Mohamed Kilani,***

J'ai toujours admiré en vous l'ardeur, le dévouement scientifique, votre sympathie et vos qualités humaines.

Veillez trouver ici, l'expression de mon profond respect et de ma grande estime.

***A Monsieur le Professeur Mohamed Aziz Darghouth,***

Je tiens à vous exprimer mes profonds remerciements et mon plus grand respect pour m'avoir dirigé dans la réalisation de ce travail avec autant de rigueur et de vigilance. Je tiens également à vous remercier pour vos qualités humaines et votre gentillesse.

Veillez trouver ici, le témoignage de mon admiration et mon profond respect.

# Remerciements

Je tiens à remercier tous les membres du Laboratoire de Parasitologie de l'Ecole Nationale de Médecine Vétérinaire de Sidi Thabet qui ont participé à la réalisation de ce travail dans une ambiance de fraternité et d'amitié.

Je tiens également à remercier Monsieur le Professeur Mohamed Habib Jemli Pour ses conseils et ses encouragements.

Je tiens à remercier Madame le Professeur Samia Lahmar pour son aide précieuse dans la réalisation de ce travail.

Je tiens à remercier Monsieur le Professeur Andrew Tait et Monsieur le Docteur William Weir pour leur contribution à la réalisation de ce travail.

Je tiens à remercier le Professeur Mourad Rekik ainsi que le Docteur Moez M'hadbi. Je tiens également à remercier Madame Hayet Sassi, Monsieur Walid Dridi, Monsieur Mehrez El Guesmi, Monsieur Béchir El Guesmi et Monsieur Tawfik Lahmar.

Enfin, je tiens à remercier le Docteur Youssr Galai et Mademoiselle Najla de l'Institut Pasteur de Tunis pour l'aide qu'ils m'ont fourni dans la réalisation de ce travail.

Mes remerciements à tous les enseignants et le personnel de l'Ecole Nationale de Médecine Vétérinaire de Sidi Thabet

# Dédicaces

Je dédie ce travail à ma mère  
Qui m'a toujours encouragé, depuis tant d'années

A mon père  
Lui, qui m'a inculqué l'amour du savoir

A mon épouse Dora  
Elle, qui m'a toujours encouragé pendant les moments difficiles

A Zeineb et Youssef  
Que Dieu tout puissant les protège et leur trace le chemin du savoir et de la bonté

A ma belle mère  
A mon beau père  
Qui m'ont toujours soutenu dans mes études

A mes frères, à mes sœurs, à mes belles sœurs et beaux frères ainsi qu'à mes  
neveux et mes nièces  
Qu'ils trouvent ici les sentiments de ma reconnaissance

A toute ma famille

A tous ceux qui m'en enseigné du primaire au supérieur

A tous mes amis

A Sassi Limam

A tous ceux qui m'ont aidé de loin ou de près

Merci

# Liste des abréviations

€: euro (1 euro vaux environ 1,610 dinars tunisiens).

**Ac** : Anticorps.

**ADN** : Acide désoxyribonucléique.

**Ag** : Antigène.

**ANOVA** : *Analysis of variance*. En français : analyse de variance.

**ARN m** : Acide ribonucléique messenger.

**BCG** : Bacille de Calmette et Guérin.

**BoLa** : *Bovine leucocyte antigen*.

**BSA** : *Bovine Serum Albumin*.

**CD** : *Cluster Differentiation*.

**CEF** : *Chick Embryo Fibroblast*. En Français : Fibroblastes d'embryon de poulet.

**CL10** : Clone 10.

**CMV** : *Cytomegalovirus*.

**CpG** : Cytosine phosphate Guanosine.

**D.O.** : Densité Optique.

**DL** : Doses létale.

**DT** : Dinars Tunisiens (1 DT vaux environ 0,62 euros), valeur 2005.

**EDTA** : Ethylène Diamine Tetraacetic Acide.

**ELISA** : Enzyme Linked Immuno-sorbent assay.

**FEP** : Fibroblastes d'embryons de poulets

**GUTS** : *Ground-Up Tick Stabilate*. En Français : Surnageant de Broyat de Tiques Infectées.

**HbcAg** : *Hepatitis B core Antigen*.

**His<sub>6</sub> tag** : protéines avec un stretch de 6 résidus d'Histidine.

**HIV** : Virus d'Immunodéficience Acquise.

**IFI** : Immunofluorescence indirecte.

**IL** : Interleukine.

**INF** : Interferon.

**ISCOM** : *Immune-stimulating complexes*. En Français : complexes immunostimulants.

**ISS** : *Intergenic stimulating sequences*.

**J** : Jour.

**Jed4** : Jedaida 4, c'est une souche tunisienne de *Theileria annulata*.

**kb** : kilobase.

**kDa** : kilo-Dalton.

**LACK** : *Leishmania homologue of receptors for activated C kinase*

**LT** : Lymphocytes T.

**M** : Molaire.

**Map** : *Major antigen protein*.

**MEM** : *Minimum Essential Medium*.

**ml** : millilitre.

**MLR** : *Mixed Lymphocyte Reaction*.

**MTS** : Tetrazolium.

**MVA** : *Modified Vaccinia virus Ankara*.

**NADH** : Nicotineamide Adénine Dinucléotide, forme réduite.

**NADPH** : Nicotineamide Adénine Dinucléotide Phosphate.

**Ni-NTA** : Nickel-Nitrilotriacetate.

**NK** : *Natural killer*.

**OIE** : Office International des Epizooties.

**ORF** : *Open Reading Frame*. En Français : Cadre de Lecture Ouvert.

**p** : valeur de signification des tests statistiques.

**PBMC** : peripheral blood monocytes cells.

**PBS** : *Phosphate Buffered Saline*. En Français Tampon Phosphate Salé.

**PCR** : *Polymerase Chain Reaction*.

**PES** : Phenazine EthoSulfate.

**pfu** : *Plaque Forming Unit*.

**pH** : potentiel hydrogène.

**PHA** : PhytoHémAgglutinine.

**PIM** : *Polymorphic Immunodominant Molecule*.



**PPA** : Protéine de la phase aiguë.

**pSG2** : plasmide isolé à partir de *Streptomyces ghanaensis*.

**Rec.** : Recombinant.

**RLB** : Reverse Line blot.

**RPMI** : *Rose Park Memorial Institute*.

**s** : strosberg.

**Scid** : *Sever combined immunodeficiency*.

**SDS PAGE** : *sulfate dodecyl sodium Polyacrylamid gel electrophoresis*.

**SIDA** : Syndrome d'ImmunoDéfiance Acquise.

**SKBA** : *SmeethKline Beecham Adjuvant*.

**SPAG** : Sporozoite antigen.

**SBTI** : Surnageant de Broyat de Tiques Infectées.

**SVF** : Sérum de veaux foetal.

**Tams** : *Theileria annulata merozoite*.

**Tash AT** : *Theileria annulata Hook AT*.

**TaSP** : *Theileria annulata Surface Protein*.

**TBS** : Tris Borate Salt buffer. En Français : tampon tris borate salé.

**Tetrazolium** : [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(2-sulfophenyl)-2H-Tetrazolium].

**TNF** : *Tumor Necrosis Factor*. En Français : Facteur de nécrose de tumeur.

**TRAP** : Thrombospondin Related Adhesive Protein.

**TTL** : Test de Transformation Lymphoblastique.

**WR** : *Western Reverse*.

## Liste des tableaux

		Page
<b>PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE</b>		
<b>Tableau I</b>	Classification et caractéristiques des <i>Theileria</i>	8
<b>Tableau II</b>	Etats endémiques de la theilériose tropicale du bœuf en Tunisie	27
<b>Tableau III</b>	Diagnostic différentiel de la theilériose avec les babésioses et l'anaplasmose	29
<b>Tableau IV</b>	Morphologie des formes érythrocytaires de <i>Theileria annulata</i>	31
<b>Tableau V</b>	Mesures de lutte raisonnées contre la theilériose tropicale en fonction de l'état endémique de l'élevage	49

## PARTIE EXPERIMENTALE

### PREMIERE PARTIE EXEPERIMENTALE

#### INFECTION DES VEAUX PAR *THEILERIA ANNULATA* EN TUNISIE : ANALYSE ÉCONOMIQUE ET ÉVALUATION DU BÉNÉFICE POTENTIEL DE LA VACCINATION

<b>Tableau I</b>	Estimation de l'impact de la theilériose tropicale à l'échelle nationale	70
<b>Tableau II</b>	Calcul du coût du crépissage des trois étables	72
<b>Tableau III</b>	Nature de l'enduit dans les locaux d'élevage en fonction de la présence ou de l'absence de la theilériose tropicale	74
<b>Tableau IV</b>	Présence de crevasses dans les bâtiments en fonction de la présence ou de l'absence de cas cliniques de theilériose tropicale	75

## DEUXIEME PARTIE EXPERIMENTALE

### INDUCTION D'UNE PROTECTION RELATIVE CONTRE UNE INFECTION D'ÉPREUVE LÉTALE PAR *THEILERIA ANNULATA* APRES VACCINATION DE VEAUX PAR LES ANTIGENES TAMS ET SPAG-1 ADMINISTRÉS PAR « *PRIME – BOOST* » HÉTÉROLOGUE. EFFET SYNERGIQUE DE L'ASSOCIATION TAMS-SPAG-1

<b>Tableau I</b>	Protocole de vaccination des veaux	88
<b>Tableau II</b>	Indicateurs de température dans les cinq groupes de veaux	97
<b>Tableau III</b>	Délais de survie dans les cinq groupes	98
<b>Tableau IV</b>	Indicateurs parasitologiques dans les étalements de sang et les biopsies des nœuds lymphatiques	99
<b>Tableau V</b>	Indicateurs relatifs à l'hématocrite dans les cinq groupes de veaux	101
<b>Tableau VI</b>	Résultats des immunodot blots aux dilutions 1/200 et 1/1000	105

## TROISIEME PARTIE EXPERIMENTALE

### LA VACCINATION DE VEAUX PAR DES ANTIGÈNES DE SCHIZONTE DE *THEILERIA ANNULATA* ADMINISTRÉS SOUS FORME D'ADN PAR « *PRIME-BOOST* » HÉTÉROLOGUE NE PROTÈGE PAS CONTRE UNE INFECTION D'ÉPREUVE LÉTALE PAR *THEILERIA ANNULATA*

<b>Tableau I</b>	Protocole de vaccination des veaux	129
<b>Tableau II</b>	Indicateurs de température dans les trois groupes de veaux (les valeurs sont données en moyenne par groupe)	136
<b>Tableau III</b>	Délais de survie dans les trois groupes	137
<b>Tableau IV</b>	Indicateurs parasitologiques dans les étalements de sang et les biopsies des nœuds lymphatiques	138
<b>Tableau V</b>	Indicateurs relatifs à l'hématocrite dans les trois groupes de veaux	141

## Liste des figures

Page

### PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

<b>Figure 1</b>	Cycle évolutif de <i>Theileria annulata</i>	11
<b>Figure 2</b>	Distribution mensuelle des cas cliniques confirmés de theilériose tropicale dans la région de Sidi Thabet durant trois années successives	20
<b>Figure 3</b>	Morphologie des formes leucocytaires et des formes érythrocytaires de <i>Theileria annulata</i> chez le bœuf	32
<b>Figure 4</b>	Structure de l'antigène SPAG-1 de <i>Theileria annulata</i> et motifs reconnus par l'anticorps anti-SPAG-1	43
<b>Carte 1</b>	Distribution géographique en Tunisie des cas cliniques de theilériose tropicale exprimés en pourcentage du total de cas déclarés en 1986	21

### PARTIE EXPERIMENTALE

#### PREMIERE PARTIE EXPERIMENTALE

#### INFECTION DES VEAUX PAR *THEILERIA ANNULATA* EN TUNISIE : ANALYSE ÉCONOMIQUE ET ÉVALUATION DU BÉNÉFICE POTENTIEL DE LA VACCINATION

<b>Figure 1</b>	Répartition des pertes en fonction de la forme clinique de theilériose tropicale en Tunisie	70
-----------------	---	----

## DEUXIEME PARTIE EXPERIMENTALE

### INDUCTION D'UNE PROTECTION RELATIVE CONTRE UNE INFECTION D'EPREUVE LETALE PAR *THEILERIA ANNULATA* APRES VACCINATION DE VEAUX PAR LES ANTIGENES TAMS ET SPAG-1 ADMINISTRES PAR « *PRIME – BOOST* » HETEROLOGUE. EFFET SYNERGIQUE DE L'ASSOCIATION TAMS-SPAG-1

<b>Figure 1</b>	Courbe des moyennes des températures des Groupes 1 (SPAG-1), 3 (Cocktail) et 5 (Témoin)	96
<b>Figure 2</b>	Courbe des moyennes des températures des Groupes 2 (Tams), 4 (Tams-MVA) et 5 (Témoin)	96
<b>Figure 3</b>	Parasitémie moyenne dans les Groupes 2 (Tams), 4 (Tams-MVA) et 5 (Témoin)	100
<b>Figure 4</b>	Parasitémie moyenne dans les Groupes 1 (SPAG-1), 3 (Cocktail) et 5 (Témoin)	100
<b>Figure 5</b>	Résultats moyens des tests de transformation lymphoblastique du Groupe 5 (Témoin) des veaux	102
<b>Figure 6</b>	Résultats moyens des tests de transformation lymphoblastique du Groupe 1 (SPAG-1)	102
<b>Figure 7</b>	Résultats moyens des tests de transformation lymphoblastique du Groupe 2 de veaux (Tams)	103
<b>Figure 8</b>	Résultats moyens des tests de transformation lymphoblastique du Groupe 3 de veaux (Cocktail)	103
<b>Figure 9</b>	Résultats moyens des tests de transformation lymphoblastique du Groupe 4 de veaux (Tams-MVA)	104
<b>Figure 10</b>	Analyse par Immunodot blot des sérums de veaux à J7 post-infection expérimentale	106

## TROISIEME PARTIE EXPERIMENTALE

### LA VACCINATION DE VEAUX PAR DES ANTIGÈNES DE SCHIZONTE DE *THEILERIA ANNULATA* ADMINISTRÉS SOUS FORME D'ADN PAR « *PRIME-BOOST* » HÉTÉROLOGUE NE PROTÈGE PAS CONTRE UNE INFECTION D'ÉPREUVE LÉTALE PAR *THEILERIA ANNULATA*

<b>Figure 1</b>	Structure génomique du vecteur pSG2 utilisé	126
<b>Figure 2</b>	Schéma du plasmide ayant servi à la construction du MVA recombinant	128
<b>Figure 3</b>	Evolution des courbes des températures moyennes dans les trois groupes de veaux	135
<b>Figure 4</b>	Parasitémie moyenne dans les groupes Vaccinés, pSG2 et Témoin	139
<b>Figure 5</b>	Index Schizonte moyen dans les groupes Vaccinés, pSG2 et Témoin	139
<b>Figure 6</b>	Evolution de l'hématocrite moyen par groupe	140
<b>Figure 7</b>	Résultats moyens du test de transformation lymphoblastique avec la PHA dans les trois groupes de veaux	142
<b>Figure 8</b>	Résultats moyens du test de transformation lymphoblastique avec l'Ag CL10 dans les trois groupes de veaux	142
<b>Figure 9</b>	Résultats moyens du test de transformation lymphoblastique avec l'Ag Tash AT 3 dans les trois groupes de veaux	143
<b>Figure 10</b>	Résultats moyens du test de transformation lymphoblastique avec l'Ag Tash HN dans les trois groupes de veaux	143
<b>Figure 11</b>	Résultats moyens du test de transformation lymphoblastique avec l'Ag PIM dans les trois groupes de veaux	144
<b>Figure 12</b>	Résultats moyens du test de transformation lymphoblastique avec un mélange des quatre Ag (CL10 + PIM + Tash HN + Tash AT 3) dans les trois groupes de veaux	144

## Sommaire

	<b>Page</b>
<b>Introduction</b>	1
<b>PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	
<b>-I- Généralités sur la theilériose tropicale du bœuf</b>	3
-I-1- Historique et synonymie	3
-I-2- Importance de la theilériose tropicale	4
-I-3- Définition et position taxonomique	7
<b>-II- Cycle évolutif</b>	8
-II-1- Chez le bovin	9
-II-2- Cycle biologique de <i>Hyalomma detritum detritum</i>	9
-II-3- Chez la tique vecteur	11
<b>-III- Pathogénie et immunité dans la theilériose tropicale</b>	12
-III-1- Aspects immuno-pathologiques de la relation bovin - <i>Theileria</i>	14
-III-2- Aspects immunologiques	14
-III-2-1- La réaction immunitaire à médiation humorale	15
-III-2-2- La réaction immunitaire a médiation cellulaire	16
<b>-IV- Symptômes</b>	17
-IV-1- Forme suraiguë	17
-IV-2- Forme aiguë	18
-IV-3- Forme atténuée	19
<b>-V- Epidémiologie de la theilériose tropicale du bœuf</b>	19
-V-1- Epidémiologie descriptive	22
-V-2- Epidémiologie analytique	22
-V-2-1- Sources du parasite	22
-V-2-2- Mode de transmission	23
-V-2-3- Réceptivité	23
-V-2-4- Facteurs favorisants	24
- Le mode d'élevage	24
- L'état de l'étable	24
- Les conditions climatiques	25
-V-3- Epidémiologie synthétique	25
-V-3-1- Endémie stable	25
-V-3-2- Etat d'endémie instable	25
- Endémie instable modérée	25

- Endémie instable élevée	26
<b>-VI- Diagnostic</b>	<b>28</b>
-VI-1- Diagnostic épidémiologique et clinique	28
-VI-2- Diagnostic nécropsique	28
-VI-3- Diagnostic différentiel	29
-VI-4- Diagnostic de laboratoire	29
-VI-4-1- Diagnostic direct	30
- Etalement de nœud lymphatique coloré au Giemsa	30
- Etalement sanguin coloré au Giemsa	30
- La réaction de polymérisation en chaîne	33
- La Reverse Line Blot	33
-VI-4-2- Diagnostic indirect	34
- Immunofluorescence indirecte	34
- Enzyme Linked Immunosorbent Assay	35
<b>-VII- Lutte contre la theilériose tropicale du bœuf</b>	<b>35</b>
-VII-1- Traitement	36
- Le traitement theiléricide	36
- Le traitement symptomatique	36
-VII-2- Prophylaxie	37
-VII-2-1- Contrôle du vecteur	37
- Elimination des gîtes de tiques dans l'élevage	37
- Lutte acaricide	37
-VII-2-2- La chimioprévention ou méthode d'infection traitement	38
-VII-2-3- La vaccination par des parasites vivants atténués	38
- Rôle des matrices métalloprotéinases	40
- Restriction du polymorphisme parasitaire et de la diversité antigénique	40
- Apparition d'altérations géniques et modification de l'expression différentielle de gènes	41
- Altération de la différenciation en mérozoïtes	41
- Réduction de la production de cytokines pro-inflammatoires	41
-VII-2-4- Perspectives d'optimisation de la vaccination contre la theilériose tropicale : les vaccins sous-unitaires contre <i>Theileria annulata</i>	41
- Immunisation avec le SPAG-1	42
- Immunisation avec le Tams	43
- Association d'antigènes de différents stades et intérêt de la vaccination par emploi d'ADN parasitaire et de vaccins vivants recombinants hétérologues	44



-VII-2-5- Stratégie de lutte contre la theilériose tropicale en Tunisie	48
<b>Références</b>	50

## **PARTIE EXPERIMENTALE**

### **PREMIERE PARTIE EXPERIMENTALE**

#### **INFECTION DES VEAUX PAR *THEILERIA ANNULATA* EN TUNISIE : ANALYSE ÉCONOMIQUE ET ÉVALUATION DU BÉNÉFICE POTENTIEL DE LA VACCINATION**

<b>Introduction</b>	64
<b>ARTICLE : infection of calves with <i>Theileria annulata</i> in Tunisia: economic analysis and evaluation of the potential benefit of vaccination</b>	
<b>Discussion de l'article</b>	67
<b>-I- Introduction</b>	67
<b>-II- Analyse financière</b>	67
<b>-III- Analyse financière à l'échelle nationale</b>	69
<b>-IV- Etude financière du crépissage des murs</b>	71
<b>-V- Limites de la lutte contre la tique vecteur</b>	73
<b>-VI- Conclusion</b>	75
<b>Références</b>	78

## DEUXIEME PARTIE EXPERIMENTALE

### INDUCTION D'UNE PROTECTION RELATIVE CONTRE UNE INFECTION D'EPREUVE LETALE PAR *THEILERIA ANNULATA* APRES VACCINATION DE VEAUX PAR LES ANTIGENES TAMS ET SPAG-1 ADMINISTRES PAR « *PRIME – BOOST* » HETEROLOGUE. EFFET SYNERGIQUE DE L'ASSOCIATION TAMS-SPAG-

1

<b>Présentation générale</b>	82
<b>Introduction</b>	83
<b>-I- Matériel et méthodes</b>	87
-I-1- Animaux	87
-I-2- Protocole de vaccination	87
-I-3- Vecteurs de vaccins et administration des vaccins	88
-I-3-1- Plasmides	88
-I-3-2- Constructions de MVA	89
-I-3-3- Protéines recombinantes	90
-I-4- Infection d'épreuve	90
-I-5- Suivi clinique	90
-I-6- Suivi parasitologique	91
-I-7- Test de transformation lymphoblastique	92
-I-8- Immunodot blot	94
-I-9- Analyses statistiques	95
<b>-II- Résultats</b>	95
-II-1- Suivi clinique	95
-II-2- Suivi parasitologique	98
-II-3- Hématocrite	101
-II-4- Test de transformation lymphoblastique	101
-II-5- Immunodot blot	104
<b>-III- Discussion</b>	106
<b>Références</b>	116

## TROISIEME PARTIE EXPERIMENTALE

### LA VACCINATION DE VEAUX PAR DES ANTIGÈNES DE SCHIZONTE DE *THEILERIA ANNULATA* ADMINISTRÉS SOUS FORME D'ADN PAR « *PRIME-BOOST* » HÉTÉROLOGUE NE PROTÈGE PAS CONTRE UNE INFECTION D'ÉPREUVE LÉTALE PAR *THEILERIA ANNULATA*

<b>Introduction</b>	122
<b>-I- Matériel et méthodes</b>	123
-I-1- Animaux	123
-I-2- Protocole de vaccination	123
-I-2-1- pSG 2	123
-I-2-2- Antigène Tash AT	124
-I-2-3- Antigène Tash HN	124
-I-2-4- Antigène PIM	124
-I-2-5- Antigène CLONE 10	125
-I-2-6- MVA avec insert	127
-I-2-7- Vecteurs de vaccination et administration des vaccins	128
-I-3- Infection d'épreuve	129
-I-4- Suivi clinique	130
-I-5- Suivi parasitologique	131
-I-6- Sérologie par Immunofluorescence indirecte	132
-I-7- Test de transformation lymphoblastique	132
-I-8- Analyses statistiques	134
<b>-II- Résultats</b>	135
-II-1- Suivi clinique	135
-II-2- Mortalité	136
-II-3- Suivi parasitologique	137
-II-4- Immunofluorescence indirecte	141
-II-5- Test de transformation lymphoblastique (TTL)	141
<b>-III- Discussion</b>	145
<b>Références</b>	150

# Partie bibliographique

## Introduction

La theilériose tropicale est une parasitose spécifique des bovinés due au protozoaire Apicomplexa *Theileria annulata* et transmise par des tiques vecteurs du genre *Hyalomma*. Cette maladie sévit sur trois continents : l'Afrique, l'Asie et l'Europe où elle représente une des principales contraintes au développement et à l'intensification de l'élevage bovin, notamment dans les pays où l'autosuffisance en lait et en viandes rouges n'est pas atteinte. En Tunisie, la theilériose tropicale cause annuellement sur un effectif national total de bovins de 654.300 (Ministère de l'Agriculture et des Ressources Hydrauliques, 1995) entre 2.500 et 3.000 cas cliniques nécessitant un traitement theiléricide (Bahri et al., 1995 ; Darghouth, communication personnelle). De plus, cette parasitose évolue sous des formes sub-cliniques encore plus fréquentes (Darghouth, 2000), qui affectent aussi bien la production de lait que de viande.

Une évaluation préliminaire de l'impact financier de la theilériose tropicale en Tunisie a permis de situer celui-ci à plus de 5 millions de Dinars Tunisiens (environ 3,1 millions d'euros) dont moins du cinquième est dû aux formes cliniques de l'infection (Darghouth, communication personnelle). Depuis l'introduction des races exotiques européennes en Tunisie et le développement de l'élevage de type intensif, cette maladie a représenté et continue à représenter un sérieux problème et ce, malgré d'importants efforts consentis par l'Etat pour la vulgarisation et la lutte acaricide.

La réussite de la lutte contre la theilériose tropicale dépend dans une large mesure d'une bonne connaissance de l'épidémiologie de cette protozoose afin d'adapter la stratégie de lutte au terrain ciblé. Globalement, celle-ci repose sur des mesures de lutte acaricide contre la tique vecteur et sur la vaccination des bovins contre *T. annulata*. La lutte acaricide reste d'efficacité insuffisante en Tunisie, notamment à cause de la mauvaise compliance des éleveurs cibles. La vaccination développée par Sergent et al. (1945) en Algérie, représente actuellement une des alternatives de lutte les plus efficaces avec l'emploi de vaccins vivants atténués en culture cellulaire.

En Tunisie, les travaux conduits depuis les années 90 au laboratoire de Parasitologie de l'Ecole Nationale de Médecine Vétérinaire de Sidi Thabet se sont intéressés à l'épidémiologie de la theilériose tropicale en Tunisie et au développement d'un vaccin vivant atténué. Ces travaux ont montré que l'infection évolue selon trois modes endémiques : l'endémie stable, l'endémie instable modérée et l'endémie instable élevée (Darghouth et al., 1996 b). En Tunisie, la majorité des cas de theilériose tropicale proviennent d'élevages en endémie instable élevée justifiant ainsi, la concentration des efforts de lutte sur cet état endémique. Dans ce contexte, un vaccin vivant atténué adapté aux particularités de l'endémie instable a été développé et testé sur plusieurs milliers d'animaux (Darghouth et al., 1999, 2003) en utilisant une technique de routage simple sans chaîne de froid (Darghouth et al., données non publiées).

Malgré leur efficacité, ces vaccins vivants atténués, présentent de multiples inconvénients qui limitent leur utilisation et leur impact en pratique : distribution le plus souvent dans l'azote liquide, risques de dissémination de contaminants pathogènes, présence de réactions post – vaccinales, utilisation empirique sans stratégie raisonnée de vaccination. Dans ce contexte, l'optimisation de l'efficacité de la vaccination contre la theilériose tropicale justifie le développement de recherches spécifiques ciblant le court et le moyen terme. A court terme, l'évaluation de l'apport financier des vaccins vivants atténués par l'estimation de leur ratio bénéfice - coût dans différents états endémiques, représente une approche pouvant conduire à rationaliser la stratégie de vaccination et à mieux l'insérer dans une approche globale de lutte.

Enfin, le développement de vaccins sous unitaires palliant les inconvénients techniques des vaccins vivants atténués représente un deuxième axe de recherche de grand intérêt, potentiellement productif à moyen et long terme.

Notre travail, s'inscrit dans cette démarche tout en s'insérant dans la continuité de l'approche de recherche suivie depuis les années 90 à l'Ecole

Nationale de Médecine Vétérinaire de Sidi Thabet, pour optimiser la lutte contre la theilériose tropicale en Tunisie. Ce travail a été divisé en deux grandes parties : une partie bibliographique et une partie expérimentale.

Dans la première partie, nous avons présenté une revue générale sur la theilériose tropicale, elle s'intéresse notamment aux aspects étiologiques, épidémiologiques, cliniques ainsi qu'à la lutte contre cette maladie en insistant en particulier sur l'impact économique de la theilériose tropicale et sur la vaccination contre la theilériose tropicale.

Dans la deuxième partie de notre thèse, nous allons présenter notre travail expérimental qui a été lui même divisé en deux chapitres. La première partie est relative à l'étude de l'impact économique de la theilériose tropicale sur la croissance des veaux, et à l'estimation du bénéfice potentiel apporté par la vaccination dans un contexte endémique particulier, celui de l'endémie stable.

Le second chapitre de notre travail expérimental s'intéresse, pour la première fois chez les bovins et dans la theilériose tropicale, à l'évaluation d'une nouvelle approche de vaccination, le « *prime-boost* » hétérologue, par utilisation de séquences d'ADN codant pour des antigènes des stades sporozoïtes, schizontes et mérozoïtes de *T. annulata*.

## **-I- Généralités sur la theilériose tropicale du bœuf**

### **-I-1- Historique et synonymie**

La première description d'un piroplasma a été faite en Roumanie par Babes en 1888, il s'agissait de *Babesia bovis* que cet auteur avait alors nommé *Protococcus bovis*. Il est reconnu que la première description de parasites appartenant au genre *Theileria* a été effectuée en Afrique du Sud par Koch en 1898. Cet auteur avait reçu une gratification, considérable à l'époque, de 20000£ attribuée par le gouvernement de la République d'Afrique du Sud.

En 1904, Lounsbury, confirme le premier, la transmission d'un parasite du genre *Theileria*, en l'occurrence *T. parva*, par des tiques vecteurs. La même année, Dschunkowsky et Luhs (1904) ont identifié dans le Caucase un parasite qu'ils nommèrent *Piroplasma annulatum* (il s'agissait certainement de *T. annulata*), qui avait une distribution géographique très différente des *Theileria* jusque là décrites.

Un an après la publication des travaux de Dschunkowsky et Luhs, Ducloux isole en Tunisie pour la première fois le parasite qu'il décrit comme un piroplasma bacilliforme. Ce n'est qu'en 1907 que Bettencourt érige le genre *Theileria* caractérisé par la présence de schizogonie leucocytaire et y intègre *T. annulata* et *T. parva*. L'équipe de Sergent réalise entre les années 1921 et 1945 à l'Institut Pasteur d'Alger, un travail considérable sur la theilériose à *T. annulata* à l'origine d'observations d'importance fondamentale et notamment, la confirmation du rôle vecteur de *Hyalomma detritum*, l'existence d'un cycle sexué de *T. annulata* chez la tique, et la mise au point du premier vaccin vivant atténué contre cette parasitose.

La theilériose bovine à *T. annulata* admet en français plusieurs synonymes : fièvre méditerranéenne ou theilériose méditerranéenne, theilériose bovine d'Afrique du Nord, theilériose bovine maligne. Cependant, l'appellation spécifique en usage chez les auteurs anglophones, tropical theileriosis, ou theilériose tropicale, serait la plus correcte, raison pour laquelle nous l'utiliserons ici.

En arabe vernaculaire, cette maladie est connue sous le nom de « bousoffir » (ou jaunisse) par allusion au tableau clinique qui peut se traduire par un ictère.

## **-I-2- Importance économique de la theilériose tropicale**

Plusieurs publications ont été consacrées à l'étude de l'impact économique de la fièvre de la côte orientale (en Anglais « *east coast fever* ») à *Theileria parva*. Néanmoins, dans la littérature internationale aucune étude n'a été consacrée à l'impact économique de la theilériose tropicale à *Theileria annulata* comme l'a signalé Mukhebi (1992). L'impact économique de la theilériose tropicale est énorme. Ainsi, depuis le début du vingtième siècle Sergent et ses collaborateurs (Donatien et Lestoquard) se sont intéressés aux piroplasmoses du fait de leur importance médicale et économique et ce sur un financement en partie fourni par les groupements d'éleveurs.



Comme toute entité pathologique, l'impact de la theilériose tropicale du bœuf se traduit par des mortalités, le coût du traitement, le coût de la lutte et un impact sur les productions.

### **Mortalité**

Cordier et Menager (1940) ont estimé qu'en absence de traitement, la létalité consécutive à un cas clinique de theilériose tropicale varie entre 50 et 100 p. cent. En Tunisie, El Fourgi et Sornicle (1967) ont estimé la létalité suite à un épisode clinique chez les animaux métis non traités à 50 p. cent, ce taux peut s'élever à 90 p. cent chez les animaux de race pie noire.

Par extrapolation des résultats de suivis de la létalité chez les bovins, soit 10 p. cent (Darghouth et Brown, 1994), les pertes par mortalité seraient de 420.000 DT (261.000 €) pour les cas déclarés uniquement (Darghouth, 2004). En effet, la theilériose tropicale n'est pas une maladie à déclaration obligatoire en Tunisie.

### **Coût du traitement**

Le traitement de la theilériose tropicale repose sur l'utilisation d'un traitement theiléricide spécifique : la buparvaquone. Cette molécule coûte très cher. D'ailleurs, la thérapeutique theiléricide chez un adulte a été estimée à environ 100 DT/animal (62 €) soit au moins 250.000 DT/an (155.000 €) pour le total des cas en Tunisie (Darghouth, 2004). L'observation de cas avérés de résistance à la buparvaquone (Naouach, 2001 ; Mhadhbi, 2004 ; Darghouth et al., soumis pour publication) rappelle ici qu'en absence de recherche internationale sur le développement de nouvelles molécules theiléricides, l'efficacité des naphtoquinones risque progressivement de s'amenuiser. Chaque recul d'efficacité de l'ordre de 10 p. cent coûterait environ 420.000 DT (261.000 €) en cas de mortalité (Darghouth et al., 2004).

## **Lutte acaricide**

Le coût de la lutte acaricide est difficile à chiffrer, du fait que les acaricides sont soit utilisés chez d'autres espèces animales (ovins) ou dans d'autres indications que la lutte contre *H. detritum*.

## **Impact sur les productions**

L'impact de la theilériose tropicale sur les productions a été peu étudié. En Tunisie, M'barek (1994) a suivi la production laitière de vaches atteintes de theilériose tropicale durant les 30 jours suivant le traitement de la maladie. La perte moyenne en lait au cours de cette période a été évaluée à 300 l/vache. L'extrapolation de ces données au nombre de cas cliniques de theilériose enregistrés en Tunisie a permis d'estimer les pertes en lait à plus de 130.000 DT (81.000 €) chez les bovins malades traités.

En Inde, Singh (1991) s'est intéressé à l'évaluation de l'impact de l'état de portage asymptomatique sur la production laitière chez des bovins métis. Après utilisation de la buparvaquone pour réduire la parasitémie chez les vaches porteuses de parasite, il a estimé que cette forme inapparente d'infection fait perdre une moyenne de 1,4 l/ jour /vache sur une période de 90 jours (soit 126 l). Il est fort probable que les pertes réelles soient encore plus importantes du fait de la persistance du parasite après traitement par la buparvaquone. En effet, Minjauw et McLeod (2003) ont estimé ces pertes à 386 litres.

Mis à part les travaux cités plus haut, à notre connaissance, aucune autre étude n'a concerné l'impact de l'infection par *T. annulata* sur le gain moyen quotidien des animaux et d'une façon générale, sur l'impact global de la maladie sur la comptabilité des élevages.

Dans ce contexte, il est intéressant de citer, à titre comparatif, les observations relatives à une maladie proche, la Fièvre de la Côte Orientale provoquée par *T. parva* et transmise par la tique *Rhipicephalus appendiculatus*. Cette maladie est présente en Afrique centrale, australe et orientale (Darghouth et al., 2003).

D'après Mukhebi (1992), la fièvre de la côte orientale provoque d'importantes pertes économiques en élevage bovin. Le coût total annuel de cette maladie a été estimé à 165 millions US \$ dans les 11 pays où la maladie sévit (Gryseels et Berkvens, 1999). A cause des coûts inhérents à la maladie et de l'état des économies des pays touchés, plusieurs études ont concerné les différentes alternatives de lutte et leurs aspects financiers.

Morzaria et al. (1988) ont étudié différentes alternatives de prophylaxie. Le bénéfice net par animal varie entre 23,3 et 31,7 US \$ chez les animaux vaccinés et entre 1,8 et 9,4 US \$ chez les animaux non vaccinés. Une autre étude basée sur le même principe a montré que le bénéfice net par kilogramme de poids vif de départ est d'environ 11 shillings kenyan (soit 1 DT ; 0,62 €) (Mukhebi et al., 1989). Ces chiffres sont très élevés, car extrapolés à un veau pesant 100 kg, elles atteindraient 100 DT (62 €) soit environ 20 p. cent de la valeur vénale de l'animal.

Par analogie avec la fièvre de la côte orientale, la theilériose tropicale représente très probablement une parasitose de grande importance économique dans les pays d'endémie. Etant donné l'apparition de cette parasitose principalement dans les petits élevages bovins à structure familiale, son impact réel, du fait de sa concentration dans ce secteur dominant de l'élevage bovin, est probablement considérable en Tunisie. L'étude de l'impact économique de la theilériose tropicale en Tunisie est d'un grand intérêt, car elle permet de rationaliser la lutte contre cette protozoose et de lui accorder l'importance qui lui revient parmi les autres priorités de santé animale.

### **-I-3- Définition et position taxonomique**

La theilériose tropicale se définit comme étant une protozoose, inoculable, infectieuse, non contagieuse due à la présence et à la multiplication dans les leucocytes mononucléés puis dans les érythrocytes des bovinés (bœuf, buffle, zébu et bison) d'un protozoaire spécifique : *Theileria annulata*, transmis par des vecteurs spécifiques du genre *Hyalomma*. La theilériose tropicale se caractérise cliniquement par l'évolution d'une anémie hémolytique fébrile accompagnée d'une hypertrophie des nœuds lymphatiques et d'autres signes cliniques variés et anatomiquement par des lésions d'inflammation de dégénérescence et

d'hémorragies sur différents organes et notamment ceux du système des phagocytes mononucléés (SPM).

La position taxonomique de l'agent étiologique de la theilériose tropicale a été révisée par Levine en 1980, et se présente comme indiqué au Tableau I.

**Tableau I**  
**Classification des *Theileria***

<b>Position taxonomique</b>	<b>Nom</b>
- Sous royaume	- Protozoa
- Phylum	- Apicomplexa
- Classe	- Sporozoea
- Sous-classe	- Piroplasmia
- Ordre	- Piroplasmida
- Famille	- Theileriidae
- Genre	- <i>Theileria</i>
- Espèce	- <i>annulata</i>

Le genre *Theileria* comporte plusieurs espèces dont le pouvoir pathogène est très variable et induit des maladies très différentes. Seul *T. annulata* agent étiologique de la theilériose tropicale du bœuf nous intéressera dans ce document.

Le génome de *T. annulata* a été récemment séquencé et publié (Pain et al., 2005), il mesure 8,35 Mb, se répartit sur 4 chromosomes haploïdes et comporte 3.792 gènes qui coderaient pour un nombre égal de protéines.

## **-II- Cycle évolutif**

Le cycle biologique de *T. annulata*, d'ailleurs, similaire à celui des autres espèces appartenant au genre (Boulter et Hall, 2000) est de type dihéteroène (Sergent et al., 1945) : il comporte une première phase qui se déroule chez la tique vecteur à savoir *Hyalomma detritum* (pour le cas de la Tunisie), et une deuxième phase qui se développe, chez l'hôte bovin.

## **-II-1- Chez le bovin (Figure 1)**

Le bovin s'infecte à partir d'une tique adulte *H. detritum* porteuse du parasite. Les sporozoïtes de *T. annulata* sont inoculés avec la salive lors du repas sanguin de l'ixodidé. Très rapidement, en quelques minutes, ces sporozoïtes infectent activement les leucocytes mononucléés (macrophages, monocytes et secondairement des lymphocytes B) (Spoonner et al., 1989) où ils évoluent en trophozoïtes. Les cellules infectées sont alors transformées et présentent des analogies avec les cellules tumorales. En effet, les trophozoïtes se transforment rapidement en macroschizontes multinucléés qui se multiplient en entraînant une division synchrone des leucocytes grâce à un effet leucomitogène (Preston et al., 1999). Il s'ensuit alors une prolifération de clones parasites qui envahissent d'abord les nœuds lymphatiques drainant le lieu de morsure de la tique, puis se disséminent à l'ensemble des structures du SPM. Après un certain nombre de multiplications, une proportion des macroschizontes se transforme en microschizontes puis en mérozoïtes qui à leur tour passent dans le milieu extracellulaire en provoquant la destruction de la cellule hôte. Ces mérozoïtes libres vont infecter des érythrocytes pour donner les piroplasmes intra-érythrocytaires. La morphologie des schizontes et des piroplasmes sera abordée dans la partie relative au diagnostic direct.

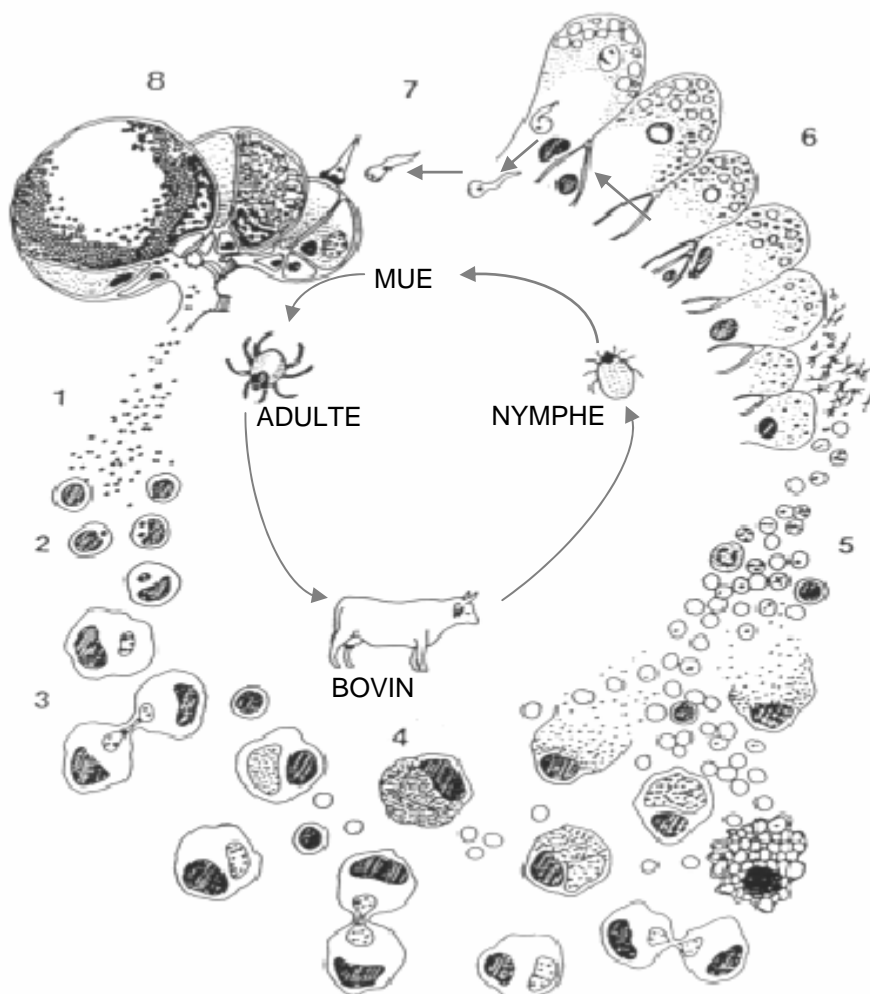
Au Maghreb, *T. annulata* est transmis par la tique vecteur *H. detritum detritum*, le cycle biologique de ce vecteur conditionne de manière importante le cycle de transmission de *T. annulata*. Avant de présenter le cycle de *T. annulata* chez la tique vecteur, nous présenterons succinctement celui de *H. detritum detritum*.

## **-II-2- Cycle biologique de *Hyalomma detritum detritum***

C'est une tique diphasique monotrope qui infeste généralement les ongulés et principalement les bovins (Morel, 1969). C'est une tique domestique, c'est à dire intimement liée aux locaux d'élevage (intérieur et pourtour des étables). Son cycle est diphasique : il fait intervenir deux phases de gorgement sur deux bovins différents (Walker et al., 2003). Les tiques du genre *Hyalomma* sont les plus xérophiles parmi tous les Ixodidés : une saison sèche est une nécessité pour cette

espèce (Morel, 1995). Cette tique a été décrite dans toute la partie nord de l'Afrique (Maroc, Algérie, Tunisie, Libye, Egypte, Soudan), en Asie où elle est largement distribuée, si bien que Hoogstraal (1956) la qualifie comme étant une tique asiatique (Moyen Orient, Chine, Inde, Asie mineure et Proche Orient) (Hoogstraal, 1956 ; Morel, 1969).

Les adultes sont actifs à partir du mois de juin jusqu'à fin août, ils vont se gorgier sur un bovin pendant en moyenne 12 jours (Bouattour et al., 1996). Les adultes se détachent, tombent sur le sol et la femelle gagne un endroit abrité pour pondre des oeufs. Les mâles peuvent changer d'hôte (Hoogstraal, 1956). Les larves apparaissent à partir du mois de septembre, les juvéniles (larves et nymphes) se gorgent sur les bovins de septembre à novembre, la larve mue en nymphe qui prend son repas sanguin sur le même animal. La durée totale de cette phase est de 16 jours en moyenne (Bouattour et al., 1996, Bouattour et al., 1999). Les nymphes gorgées effectuent une diapause hivernale dans les gîtes offerts par les locaux d'élevage qui sont les plus chauds et les plus exposés au soleil. Les adultes apparaissent l'été suivant.



**Figure 1**  
Cycle évolutif de *Theileria annulata* (D'après Tait et Hall, 1990)

- |   |  |
|---|--|
| 1. Sporozoïtes  | 5. Erythrocytes infectés                                       |
| 2. Macrophages infectés                                       | 6. Glandes salivaires de tiques infectées par des sporoblastes |
| 3. Macroschizonte induisant une mitose des cellules infectées | 7. Kinètes   |
| 4. Microschizonte   | 8. Sporoblaste   |

### -II-3- Chez la tique vecteur

Les stases immatures, surtout les nymphes, s'infectent à l'occasion d'un repas sanguin sur un bovin porteur de formes érythrocytaires de *T. annulata*. Le développement parasite se déroule au niveau de l'intestin de la nymphe. Il commence par une phase de gamétogonie donnant des gamètes qui fusionnent

pour donner un zygote de forme sphérique. Les zygotes envahissent les cellules intestinales où ils s'enkystent durant toute la période d'hibernation de la nymphe de *H. detritum*. La reproduction sexuée de *T. annulata* a été démontrée par le fait que les tiques se gorgeant sur des bovins infectés par deux clones différentes, donne des zygotes recombinants (Ben Miled, 1994). Lors de la mue de la tique, le zygote se transforme en kinète mobile qui gagne via l'hémolymphe, les glandes salivaires où il va subir une sporogonie et se transformer en sporonte. Le développement de *Theileria* est bloqué à ce stade jusqu'au moment où la tique commence son repas sanguin. Après trois multiplications sporogoniques, il se forme un nombre très élevé de sporozoïtes (jusqu'à 40 000 / sporonte). Ces sporozoïtes seront massivement inoculés avec la salive vers le 3 – 4 ème jour de fixation de la tique adulte sur le bovin (Samish et Pipano, 1981).

### **-III- Pathogénie et immunité dans la theilériose tropicale**

Le pouvoir pathogène des parasites du genre *Theileria* varie en fonction de l'espèce. Certaines, sont pratiquement non pathogènes chez l'hôte sain (cas de *T. buffeli*), d'autres sont très pathogènes et conduisent à une maladie grave (cas de *T. annulata* et *T. parva*). Le pouvoir pathogène varie également en fonction des souches de parasite. En effet, certaines souches de *T. annulata* sont très virulentes (souche Jed 4 isolée en Tunisie par Darghouth et al. (1996 a)), d'autres sont tellement peu virulentes qu'elles ont été utilisées comme souches vaccinales (souche Kouba, isolée par Sergent et al. en 1945).

Les schizontes de *T. annulata* possèdent des propriétés de transformation qui s'accompagnent d'une prolifération clonale incontrôlée et d'une expansion clonale des cellules infectées T (Dobbelaere et Rottenberg, 2003). Le comportement des cellules transformées ressemble à celui des cellules cancéreuses. D'ailleurs, injectées à des souris immunodéprimées, elles sont à l'origine de processus tumoraux. Dans certains cas, ces cellules montrent un potentiel métastatique plus important que celui des cellules de lymphosarcomes bovins. L'animal présente alors une réaction inflammatoire généralisée qui explique plusieurs symptômes (abattement, hyperthermie, congestion...). Le facteur nucléaire kappa B (FNK-B) est un facteur de transcription phylogénétiquement conservé et qui intervient dans la régulation des processus de différenciation, de développement et de l'apoptose.



C'est également un régulateur des processus inflammatoires et de la réponse immune. Toutes les voies d'activation convergent à un large éventail de complexes appelés I-kappa B kinase (IKK). Lorsque le I-kappa B est phosphorylé par le IKK, il devient une cible de la dégradation par les protéosomes (Dobbelaere et Rottenberg, 2003). Lors de l'infection des cellules bovines par *T. annulata* un processus connu sous le nom d'activation induite par la proximité « *proximity-induced activation* », durant lequel une oligomérisation conduit à une action du IKK par trans-autophosphorylation et ce sans l'intervention d'une voie externe. Ce processus explique bien l'immortalisation des cellules infectées par *T. annulata*.

Une autre voie a été également incriminée dans le processus d'immortalisation, il s'agit de la voie des phospho-inositide 3 kinases. Cette voie est capitale dans les processus d'oncogenèse chez d'autres espèces animales, elle est activée par plusieurs effecteurs, notamment les facteurs de croissance et les récepteurs immunologiques (Dobbelaere et Rottenberg, 2003). Elle s'est avérée nécessaire à la prolifération des cellules transformées par *T. annulata*. Néanmoins, il n'a pas été démontré que cette voie joue un rôle dans la régulation de la survie des cellules transformées. La résistance à l'apoptose est également assurée chez *T. parva* par l'expression de protéines anti-apoptose tels que c-FLIP, c-IAP1/2 et X-IAP. Néanmoins, ce phénomène n'a pas été démontré chez *T. annulata*.

En définitive, en détournant le réseau de signaux par différentes voies biochimiques et immunologiques, *T. annulata* induit une prolifération cellulaire non contrôlable qui échappe aux mécanismes de régulation et évite de plus l'apoptose des cellules non transformées.

La pathogénie de la theilériose tropicale demeure actuellement mal connue. Les schizontes leucocytaires représentent très certainement le principal stade pathogène chez les bovins, notamment du fait de leur multiplication intense chez l'hôte. Ainsi, lors d'infection expérimentale, les premiers signes de maladie se déclarent avant l'apparition des premiers stades

érythrocytaires du parasite (Darghouth et al., 1996 a). De plus, certaines souches de *T. annulata* ayant perdu la capacité de produire des formes érythrocytaires restent encore pathogènes (Brown, 1990).

Par leur action leucomitogène, les schizontes, conduisent à une prolifération clonale des cellules infectées qui se trouvent disséminées dans divers organes du système des phagocytes mononucléés. Le stade schizonte de *T. annulata* est à l'origine de deux grands mécanismes pathogéniques :

- Activation polyclonale des cellules T notamment CD4+ qui bloque le montage d'une réponse immunitaire spécifique (Preston et al., 1999).
- Production de facteurs phlogogènes multiples, cytokines pro-inflammatoires (Preston et al., 1999), libération de protéines issues de la lyse des cellules infectées qui conduisent à une activation d'une part du complément par la voie alterne et d'autre part du cycle de la coagulation (Irvin et Morrison., 1987). Ces facteurs phlogogènes sont responsables de l'apparition d'un état d'inflammation généralisée et de perturbation circulatoire et de l'hémostase qui expliquent une grande partie des signes cliniques de la theilériose tropicale.

Les formes érythrocytaires de *T. annulata* contribuent à cette pathogénie et notamment à l'apparition d'un état d'anémie hémolytique (Darghouth et al., 2003)

### **-III-1- Aspects immuno-pathologiques de la relation bovin - *Theileria***

Les phénomènes immuno-pathologiques jouent un rôle fondamental dans la pathogénie de la theilériose tropicale. Les cellules infectées par *T. annulata* produisent des cytokines pro-inflammatoires : IL-1 (Interleukine-1), IL-6 et TNF $\alpha$  « *Tumor necrosis factor* » et expriment des niveaux très élevés d'ARNm (Acide ribonucléique messenger) de ces protéines (Glass, 2002). Ces mêmes cytokines sont aussi produites par les macrophages activés, les cellules NK et les cellules CD4+ en prolifération non spécifique sous l'effet des parasites. D'ailleurs, l'augmentation importante de certaines protéines de la phase aiguë (PPA) chez les bovins malades représente un excellent indicateur de la libération de cytokines pro-inflammatoires d'origine macrophagique comme l'IL-1, IL-6 et du TNF $\alpha$  (Preston et al., 2002 ; Glass et al., 2003). Ces cytokines pro-inflammatoires jouent probablement un rôle primordial dans la pathogénie de la theilériose tropicale du bœuf (Glass et al., 2005) comme l'indique notamment la corrélation positive entre

les concentrations des PPA dans la circulation et la sévérité de la maladie (Glass et al., 2003). D'ailleurs, l'infection de bovins par des lignées cellulaires infectées produisant des niveaux élevés de cytokines pro-inflammatoires détermine une maladie plus grave que celle engendrée par les lignées produisant de faibles niveaux de ces cytokines (Graham et al., 2001). La production excessive de TNF par les animaux malades explique une partie importante des signes cliniques de theilériose comme notamment, l'abattement, la fièvre, l'hyporexie, la cachexie, la leucopénie et les atteintes hémorragiques (Darghouth et al., 2006).

Les cellules infectées par *T. annulata* sont capables d'induire une prolifération polyclonale non spécifique des lymphocytes T et notamment des lymphocytes T CD4+. Ce phénomène, induit par contact cellulaire direct et par les cytokines produites aussi bien par les cellules infectées que celles en prolifération, entraîne un blocage de la reconnaissance de l'antigène et de l'expression des mécanismes effecteurs de l'immunité. La survie à l'infection dépendrait de la capacité du bovin à réguler cette prolifération par des mécanismes suppresseurs mettant notamment en jeu les macrophages (Preston et al., 2002).

### **-III-2- Aspects immunologiques**

Les interactions cellulaires initiales ainsi que l'activation de différentes sous-populations lymphocytaires conduisant au développement de l'immunité anti-*Theileria* sont encore mal connues (Nichani et al., 2003). Dans l'organisme du boviné infecté, se développe une réaction immunitaire double : à médiation humorale et cellulaire.

#### **-III-2-1- La réaction immunitaire à médiation humorale**

La présence de *T. annulata* induit la synthèse d'anticorps anti-sporozoïtes, anti-mérozoïtes et anti-schizontes. Le rôle protecteur de ces anticorps n'a pas été démontré, mais leur présence est exploitée pour la mise en évidence de l'infection (tests sérologiques : IFI et ELISA). Néanmoins, *In*

*vitro*, le pouvoir invasif des sporozoïtes se trouve diminué en présence de sérum anti-sporozoïtes.

### **-III-2-2- La réaction immunitaire à médiation cellulaire**

Malgré le fait que tous les mécanismes inhérents à la protection des animaux (infectés ou vaccinés) n'ont pas encore été totalement élucidés, il demeure certain que la RIMC est la composante protectrice de la riposte immune (Preston et al., 1999 ; Glass, 2001). L'immunité innée représente la première ligne de défense contre l'infection, ses effecteurs sont représentés par les macrophages activés ainsi que les cellules NK (Preston et al., 1999). L'environnement en cytokines accompagnant cette réponse jouerait un rôle important dans la polarisation de l'immunité spécifique vers un profil de type Th1. Celle-ci repose sur l'apparition d'une réponse T CD4+ induisant l'apparition de cellules T CD8+ et de macrophages activés (Preston et al., 1999, Darghouth et al., 2003). Ces dernières cellules représentent très probablement un important effecteur de l'immunité. En effet, ces macrophages produisent des cytokines et notamment le TNF alpha (Preston et al., 1999) et du monoxyde d'azote (Richardson et al., 1998) qui exercent une action cytotatique sur les cellules infectées de schizontes. Nichani et al. (2003) ont montré que la lymphé efférente des nœuds lymphatiques satellites chez des animaux immunisés par des cultures cellulaires est riche en cellules T CD4+ dont le quantum n'a pas diminué au cours de l'essai. De plus, on constate deux pics de lymphocytes CD8+ : le premier coïncide avec une activité cytotoxique contre les parasites. Le deuxième, observé vers le 13 ème jour post-infection, correspond à une activité cytotoxique dirigée contre les cellules autologues infectées par le parasite. Ce deuxième pic est corrélé avec la clairance du parasite au niveau de la lymphé efférente (Nichani et al., 2003). Cette activité cytotoxique d'allure bimodale a également été observée au niveau du sang périphérique (Innes et al., 1989). Contrairement aux macrophages activés, la réponse lymphocytaire T CD8+ semble plus spécifique. En effet, Conze et al. (1998) ont montré *in vitro* que la lyse de cellules infectées de schizontes est optimale avec la souche homologue (infection d'épreuve réalisée avec le même isolat que celui utilisé dans l'immunisation) et significativement plus faible avec des souches hétérologues de *T. annulata* (infection d'épreuve réalisée avec un isolat différent de celui utilisé

dans l'immunisation) et significativement plus faible avec des souches hétérologues de *T. annulata* (infection d'épreuve réalisée avec un isolat différent de celui utilisé dans l'immunisation).

#### **-IV- Symptômes**

Le tableau clinique de la theilériose s'installe après, en moyenne, 15 jours d'incubation (Sergent et al., 1945), avec des intervalles extrêmes qui peuvent aller de 8 à 31 jours et ce en fonction de plusieurs facteurs tels que la dose infectante, l'état immunitaire de l'animal et la virulence de la souche. La sévérité du tableau clinique dépend de trois facteurs : (i) la virulence de la souche de *T. annulata* (ii) la dose infectante inoculée, elle-même dépendant de l'intensité d'infection des glandes salivaires des tiques ainsi que du nombre de tiques infectées qui parasitent le bovin, (iii) la sensibilité de l'animal elle-même conditionnée par des facteurs génétiques, l'âge, le degré d'immunocompétence...

La theilériose tropicale du bœuf évolue selon trois formes : suraiguë, aiguë et chronique :

##### **-IV-1- Forme suraiguë**

Elle se caractérise par un tableau clinique d'emblée dramatique. L'animal présente :

- une hyperthermie qui peut aller jusqu'à 42°C,
- une hypertrophie des nœuds lymphatiques qui touche surtout les nœuds lymphatiques drainant le lieu de fixation de la tique (surtout rétro-mammaires et précruraux), parfois cette hypertrophie est généralisée,
- un ictère franc apparaissant d'emblée,
- des troubles nerveux,

L'évolution de la maladie est dramatique, en l'absence de traitement, la mort survient en deux à trois jours.

#### **-IV-2- Forme aiguë**

C'est la forme la plus typique de theilériose, elle se caractérise par :

- Une hypertrophie des nœuds lymphatiques, le plus souvent généralisée. Les nœuds lymphatiques présentent un œdème périphérique caractéristique, ils sont de plus chauds et douloureux.
- Un cortège fébrile net : la température peut atteindre 40, voire 42°C. L'abattement, l'hyporexie voire l'anorexie ainsi que la chute plus ou moins brutale de la lactation représentent en pratique les principaux signes d'appel du vétérinaire.
- Un syndrome hémolytique : l'anémie d'origine hémolytique est constante. Elle a une double origine : développement de mécanismes auto-immuns et une action mécanique des parasites. L'hémolyse s'installe après 2 à 3 jours de congestion des muqueuses. L'ictère, d'apparition tardive, n'est pas constant. Lorsqu'il apparaît, c'est un signe de mauvais pronostic. L'hémoglobinurie est très inconstante, et représente un signe de gravité.
- Des pétéchies, des suffusions ou des ecchymoses sont observées, il s'agit de signes indicateurs d'un mauvais pronostic.

D'autres signes non spécifiques peuvent être observés :

- Des avortements chez les femelles en fin de gestation,
- Des signes nerveux, notamment en phase terminale de la theilériose tropicale,
- Des troubles digestifs : diarrhée avec melæna, indigestion du feuillet,
- Des troubles respiratoires : broncho-pneumonie,
- Beaucoup plus rarement, une gangrène sèche de la peau sur la ligne du dos et qui représente un signe de très mauvais pronostic.

Non traitée, cette forme évolue vers l'aggravation du tableau clinique et la mort survient en 7 à 15 jours dans un état d'épuisement total après une accentuation du syndrome anémique et hémolytique et l'apparition plus fréquente à ce stade de l'ictère, de hémoglobinurie et des troubles hémorragiques et nerveux.

### **-IV-3- Forme atténuée**

Elle est fréquente notamment chez les animaux de la population autochtone. Tous les signes sont moins dramatiques et l'évolution se fait vers la guérison qui survient après une période de convalescence plus ou moins longue. Parfois, ces formes atténuées peuvent dégénérer en formes chroniques accompagnées d'anémie intense et de cachexie et sont souvent mortelles.

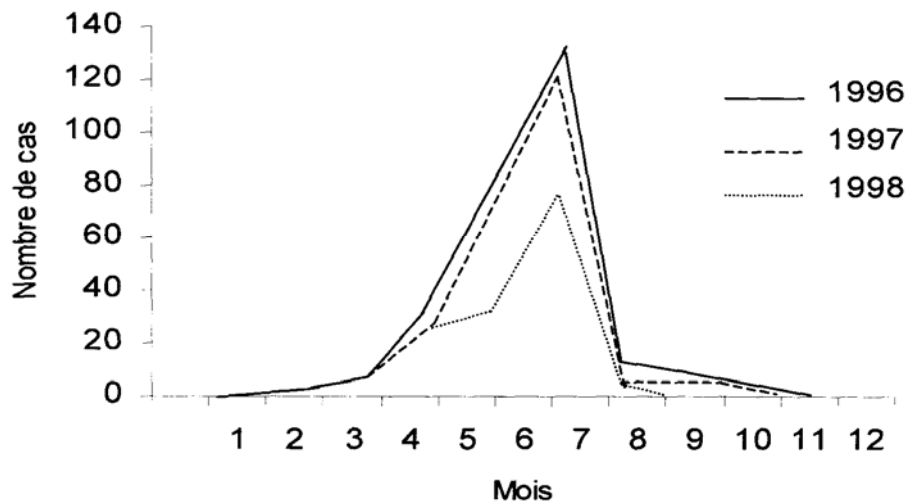
Dans certains cas, la theilériose survient sans signes cliniques spécifiques : il s'agit d'une altération modérée de l'état général, un fébricule, parfois, une hypertrophie des nœuds lymphatiques modérée et une anémie discrète. L'infection habituellement non diagnostiquée passe inaperçue, mais reste grave du fait de ses répercussions sur la productivité des animaux atteints.

## **-V- Epidémiologie de la theilériose tropicale du bœuf**

### **-V-1- Epidémiologie descriptive**

En Tunisie, la theilériose tropicale du bœuf est une maladie qui évolue durant la période chaude, c'est d'ailleurs la maladie estivale des bovins par excellence. La saisonnalité de la maladie est en relation avec la dynamique d'activité de la tique vecteur. Bouattour et al. (1996) ont montré que le pic de l'incidence clinique de la theilériose tropicale survient 15 jours après le pic d'infestation par les tiques vecteurs *H. detritum detritum*.

En Tunisie, cette maladie est observée entre mai et septembre avec un pic d'incidence en juillet – août (Darghouth et al., 1996 c; Darghouth et al., 1999). Ainsi, 95 p. cent des cas cliniques de theilériose tropicale diagnostiqués au Laboratoire de l'Ecole Nationale de Médecine Vétérinaire de Sidi Thabet (Tunisie) le sont entre les mois de mai et août (Darghouth et al., 1999) (Figure 2).



**Figure 2**  
**Distribution mensuelle des cas cliniques confirmés de theilériose tropicale dans la région de Sidi Thabet durant trois années successives (1996, 1997 et 1998)**  
 (Darghouth et al., 1999)

Des cas de rechutes consécutives à un déséquilibre de la relation hôte – parasite peuvent avoir lieu à n'importe quel moment de l'année et donnent des formes qui peuvent être graves. La distribution de la maladie dans le temps est très différente dans l'Oasis de Gabès (Sud Est de la Tunisie). En effet, la maladie commence en août pour atteindre un maximum d'incidence en septembre, les derniers cas sont observés en octobre - novembre (Gosrani, 1999). Ce décalage de la distribution des cas serait dû à deux facteurs : (i) l'intervention potentielle de *H. dromedarii* dans la transmission de la maladie, (ii) l'impact du climat oasien qui est chaud et humide. Il y aurait alors soit deux générations de tiques adultes soit un étalement de l'activité des tiques dans le temps et une entrée plus tardive en hibernation.

En Tunisie, la majorité des cas cliniques de theilériose tropicale est observée dans la zone sub-humide et semi-aride où le vecteur *H. detritum detritum* est la tique commune (Bouattour, 1996 ; Darghouth et al, 1999 ; Bouattour, 2001). De même, ces deux zones bioclimatiques concentrent la majorité du cheptel bovin



de race pure. Dans l'étage bioclimatique aride, seuls 6 p. cent des cas sont annuellement rapportés (Carte 1). Enfin, dans la zone bioclimatique saharienne il n'y a pratiquement pas de cas cliniques de theilériose tropicale du fait de l'absence du vecteur et de la rareté de l'hôte vertébré. Il s'agit en fait de zones d'élevage quasi-exclusif de petits ruminants et de dromadaires.



**Carte 1**  
**Distribution géographique en Tunisie des cas cliniques de theilériose tropicale exprimés en pourcentage du total de cas déclarés en 1986 (Darghouth et al., 1999)**

## **-V-2- Epidémiologie analytique**

### **-V-2-1- Sources du parasite**

Les sources directes des parasites sont représentées par les tiques adultes appartenant au genre *Hyalomma* qui vont transmettre la maladie à l'occasion d'un repas sanguin.

Les sources indirectes sont représentées par les bovinés porteurs de *T. annulata* qui vont infecter, à l'occasion du repas sanguin, les larves et les nymphes de *H. detritum*.

### **-V-2-2- Mode de transmission**

La transmission de *T. annulata* est assurée par la salive de la tique adulte dès le troisième jour du repas sanguin. La transmission par les seringues contaminées est possible, mais son rôle dans l'épidémiologie de la theilériose tropicale demeure accessoire.

### **-V-2-3- Réceptivité**

Plusieurs facteurs interviennent dans la réceptivité des animaux à la theilériose tropicale du bœuf.

### **L'espèce**

Seuls les bovinés sont susceptibles à la theilériose tropicale. Ainsi, le bœuf (*Bos taurus*), le buffle d'eau (*Bubalis bubalis*) et le zébu (*Bos indicus*) sont réceptifs à des degrés très variables à *T. annulata*. Les bovinés sauvages le sont également et ils expriment des formes d'intensité variable d'infection.

Glass et al. (2005) ont montré que les veaux zébu de race Sahiwal (*Bos indicus*) expriment un tableau clinique significativement moins grave que les veaux de race Holstein (*Bos taurus*). Les veaux Shahiwal présentent un accès fébrile plus court, 2,3 jours en moyenne, contre 7 jours chez les Holstein, et montrent des concentrations significativement plus faibles et plus fugace d'une PPA : l'acide alpha 1 glycoprotéique.

### **La race**

La réceptivité des bovins à la theilériose varie en fonction de la race. Les races autochtones sont habituellement plus résistantes et seuls quelques sujets développent une forme atténuée de la maladie. Par contre, les races améliorées telles que la Frisonne pie noire, la Holstein ou les produits de leurs croisements sont plus sensibles. L'effet de la race est bien illustré par l'observation en Tunisie, dans des étables en situation d'endémie stable de theilériose d'une corrélation positive entre l'incidence de la maladie chez les veaux et leur phénotype. Ainsi en 1991, l'incidence de cas cliniques était de 7,7 p. cent et l'ensemble des veaux présentaient un phénotype local (Darghouth et al., 1996 b). En 1994, 50 p. cent des veaux exprimaient un phénotype pie noire: l'incidence de cas cliniques était montée à 21 p. cent (Soudani, 1995). Enfin, en 2001, l'ensemble des veaux avaient un phénotype pie-noire et l'incidence de cas cliniques atteignait 52 p. cent (Karoui, 2002).

D'après Glass (2001), la sensibilité des bovins à la theilériose tropicale est déterminée par la régulation des conséquences immuno-pathogéniques de la réponse immune à l'infection. Celle-ci serait bien régulée chez les animaux autochtones issus d'une co-existence millénaire avec le parasite, contrairement aux races exotiques non adaptées à ce dernier. Cette grande sensibilité serait d'ailleurs amplifiée par les contraintes de production plus élevée pour lesquels ces races ont été sélectionnées.

### **-V-2-4- Facteurs favorisants**

Les facteurs favorisant le développement de la maladie sont au nombre de trois : le mode d'élevage, l'état de l'étable et les conditions climatiques.

#### ***Le mode d'élevage***

Du fait que la tique vecteur *H. detritum* est endophile, les animaux élevés en plein air sont de loin moins exposés à la maladie que ceux vivant dans des étables. D'ailleurs, Sergent et al. (1945) ont proposé comme moyen de lutte

contre la theilériose tropicale, l'élevage des animaux en plein air et loin des étables.

### ***L'état de l'étable***

Les étables mal conçues dont les murs présentent des crevasses, des fissures offrent de nombreux gîtes favorables au développement à la tique vecteur endophile domestique. A l'opposé, les étables bien entretenues n'hébergent généralement pas de tiques. Pour preuve, l'absence en Tunisie, de cas cliniques de theilériose tropicale dans les étables modernes bien conçues.

### ***Les conditions climatiques***

Elles interviennent en conditionnant l'activité de la tique. Il a été constaté en Tunisie que les épisodes de sirocco entraînent la sortie massive de vagues de tiques de leurs gîtes et par conséquent, une augmentation différée dans le temps, de l'incidence de la theilériose tropicale. De plus, Sergent et al. (1945) ont noté que les cas cliniques de theilériose tropicale sont plus graves en présence de sirocco.

### **-V-3- Epidémiologie synthétique (Tableau II)**

Par analogie à la typologie épidémiologique de la babésiose à *Babesia bovis* en Australie (Mahoney, 1977), Darghouth et al. (1996 b) ont étudié la typologie épidémiologique de la theilériose tropicale du bœuf en Tunisie. En se basant sur trois critères épidémiologiques simples : (i) séroprévalences avant et après la saison de theilériose tropicale, (ii) l'incidence de cas cliniques, (iii) le risque relatif de maladie, c'est à dire le ratio de l'incidence clinique par rapport à la séroprévalence. Darghouth et al. (1999) ont ainsi identifié deux situations endémiques : l'endémie stable et l'endémie instable. Cette dernière est elle-même subdivisée en endémie instable modérée et endémie instable élevée (Darghouth et al., 1996 b).

### **-V-3-1- Endémie stable**

L'état d'endémie stable est la résultante d'une infection précoce par *T. annulata* de tous les veaux dès leur première saison estivale. Comme tous les veaux sont très faiblement infestés par la tique vecteur (Bouattour, 1996), ils sont donc progressivement immunisés contre la theilériose tropicale avec de faibles doses infectantes (notion d'effet dose). Les cas cliniques sont virtuellement absents chez les animaux de plus d'une saison estivale car ils sont immunisés dès leur jeune âge. Cette situation endémique correspond aux élevages de type traditionnel où la population de tiques vecteurs est très élevée.

D'un point de vue sérologique, l'état d'endémie stable se caractérise par une séroprévalence automnale de 100 p. cent chez les veaux en première saison estivale. Néanmoins, seuls 7,7 p. cent des veaux expriment une forme clinique de theilériose tropicale (Darghouth et al., 1996 b).

Cette situation épidémiologique est observée dans 3,8 p. cent des élevages tunisiens (Darghouth et al., 2003).

### **-V-3-2- Etat d'endémie instable**

Il s'agit d'un état endémique polymorphe caractérisé par une population de tiques vecteurs insuffisante pour assurer l'infection des veaux en première saison estivale. Il est possible de reconnaître dans cet état deux situations endémiques : l'endémie instable modérée et l'endémie instable élevée.

#### ***Endémie instable modérée***

Les cas cliniques de theilériose affectent les bovins jusqu'à l'âge de 3 étés, en pratique les jeunes veaux en première saison estivale sont peu affectés à cause de leur faible réceptivité aux tiques. Par contre, les animaux de plus de 3 étés sont en totalité naturellement immunisés.

Le taux d'infestation des animaux adultes par les tiques est modéré, il est inférieur à 50 tiques / vache -saison.

L'endémie instable modérée est observée chez respectivement 19,6 et 28 p. cent des élevages dans la zone semi-aride et la zone sub-humide (Darghouth et al., 1999).

### **Endémie instable élevée**

La séroprévalence automnale est inférieure à 100 p. cent chez toutes les catégories d'âges. Les cas cliniques sont observés même chez les animaux de quatre saisons estivales et plus, et notamment les vaches laitières du fait de leur effectif important dans les étables à risque et probablement aussi du stress de production auquel elles sont exposées.

L'état d'endémie instable élevée est lié à une faible population de tiques vecteurs. En effet, l'intensité d'infestation moyenne par les tiques chez les vaches adultes est de 3 tiques / vache – saison (Lebbi, 1991).

L'endémie instable élevée est de loin la plus fréquente en Tunisie. Cette situation est décrite chez 76,2 et 72 p. cent des élevages se trouvant respectivement dans les zones semi-arides et sub-humides (Darghouth et al., 2003).

**Tableau II**  
**Etats endémiques de la theilériose tropicale du bœuf en Tunisie (Darghouth et al., 1999)**

<b>Etat endémique</b>	<b>Populations de tiques vecteurs</b>	<b>Types d'élevages</b>	<b>Incidence de la maladie</b>	<b>Prévalence sérologique</b>	<b>Population à risque</b>	<b>Fréquence en Tunisie</b>
<i>Endémie stable</i>	Elevée : > 50 tiques/ animal saison	- Bovins métis - Races pures : +/-	Faible	Proche de 100 %	- Veau en première saison estivale - Nouveaux venus	< 5 % des élevages
<i>Endémie instable modérée</i>	Importante : < 50 tiques /animal saison	- Bovins métis - Races pures : +/-	Elevée à modérée	A partir de la troisième saison estivale : 100 %	Animaux jusqu'à trois étés	19 à 20 %
<i>Endémie instable élevée</i>	Faible : < 5 à 10 tiques/animal saison	Races pures	Faible	Faible à modérée	Vaches laitières	76 à 81 %

## **-VI- Diagnostic**

Le diagnostic de la theilériose tropicale est d'abord épidémioclinique, il permet souvent de poser un diagnostic de certitude de la maladie. Compte tenu des similitudes avec plusieurs autres entités pathologiques, ce diagnostic est également différentiel. Enfin, le diagnostic de confirmation est apporté par le recours au laboratoire.

### **-VI-1- Diagnostic épidémiologique et clinique**

Le diagnostic épidémiologique et clinique de la theilériose est facile dans les régions d'endémie notamment dans les formes aiguës de maladie. Il s'agit d'un tableau clinique évoluant durant la période estivale, chez des animaux ayant été infestés par les tiques vecteurs et vivant dans des élevages ayant connu des antécédents de cas cliniques de theilériose tropicale. Les murs des étables sont crevassés ou non crépis. Néanmoins, l'absence de tiques chez un animal ne doit en aucun cas motiver l'élimination de la theilériose comme hypothèse diagnostique.

L'animal présente une triade symptomatique : un cortège fébrile, un syndrome hémolytique et une hypertrophie des nœuds lymphatiques. Généralement, le motif de consultation est l'anorexie (ou l'hyporexie) et l'agalaxie (ou l'hyposalaxie). Il s'agit de signes pour lesquels tous les éleveurs sont sensibles : « la vache ne mange plus et produit moins de lait ».

Dans la forme atténuée, la forme chronique et la forme suraiguë, le diagnostic épidémioclinique est plus difficile.

### **-VI-2- Diagnostic nécropsique**

Selon la forme clinique de la theilériose, le cadavre présente assez souvent un état de cachexie plus ou moins prononcé. Les séreuses et les muqueuses sont de couleur blanche, jaune ou jaune flamboyant. Ces colorations sont plus ou moins prononcées selon le stade évolutif de la maladie.



On note la présence d'un oedème pulmonaire. La splénomégalie et l'hépatomégalie sont constantes. Les nœuds lymphatiques superficiels et profonds sont hypertrophiés, ils sont œdématiés. La caillette présente des ulcères avec des centres nécrotiques, ces lésions peuvent également être rencontrées tout au long de l'intestin grêle et du gros intestin.

### -VI-3- Diagnostic différentiel

Parfois le tableau clinique n'est pas pathognomonique, le diagnostic différentiel de la theilériose tropicale du bœuf est à poser avec plusieurs entités pathologiques, notamment les maladies estivales. Il s'agit des babésioses et de l'anaplasmose. Les éléments de diagnostic différentiel ont été consignés dans le Tableau III.

**Tableau III**  
**Diagnostic différentiel de la theilériose avec les babésioses et l'anaplasmose**  
 (D'après Darghouth et al., 2003)

Maladie	Agent	Principaux vecteurs	Signes cliniques
Babésioses	<i>Babesia bovis</i>	<i>Boophilus annulatus</i> <i>Rhipicephalus bursa</i>	- Ictère franc - Hémoglobinurie moins importante - Urines de couleur bordeaux
	<i>Babesia bigemina</i>	<i>Boophilus annulatus</i> <i>Rhipicephalus bursa</i>	- Ictère - Hémoglobinurie : urines brun café - Symptômes nerveux avec excitation ou abattement
Anaplasmose	<i>Anaplasma marginale</i>	- Vecteurs biologiques (Ixodidés) - Vecteurs mécaniques (Diptères piqueurs)	- Anémie avec muqueuses blanc porcelaine - Atonie constante du rumen (entraîne une indigestion chronique du feuillet) - Amaigrissement prononcé

Dans sa phase de début, la theilériose tropicale est à différencier de toutes les maladies donnant un cortège fébrile et une hypogalactie (ou agalactie), seuls symptômes observés au début d'une forme clinique de theilériose tropicale.

### -VI-4- Diagnostic de laboratoire

Vu l'importance médicale et économique de la theilériose tropicale et le coût du traitement, le diagnostic biologique sur le vivant de l'animal est très important à

envisager. Il est divisé en diagnostic direct et indirect.

#### **-VI-4-1- Diagnostic direct**

##### ***Etalement de nœud lymphatique coloré au Giemsa***

Cette technique a été utilisée depuis les années 30 par Sergent et al. (1945). Elle consiste en la mise en évidence de schizontes, durant le pic d'hyperthermie, sur un frottis réalisé à partir d'une biopsie de nœud lymphatique ou du foie (Figure 3). Ce prélèvement a l'avantage de permettre un dépistage précoce et spécifique de l'infection, mais il est difficilement réalisable dans les conditions de terrain car il requiert de la part du praticien une dextérité dans la réalisation de la biopsie et dans la confection des étalements qu'il devra réaliser dans l'étable.

##### ***Etalement sanguin coloré au Giemsa***

C'est actuellement la technique de diagnostic de laboratoire la plus pratiquée en vue de la confirmation d'une suspicion. Elle permet la mise en évidence des formes érythrocytaires de *T. annulata* dans le sang, en moyenne à partir du 9<sup>ème</sup> jour de l'infection (Sergent et al., 1945). Cette technique consiste à prélever quelques gouttes de sang veineux sur un tube contenant de l'anticoagulant. L'EDTA a un effet anticoagulant meilleur que l'héparine du fait de ses effets antioxydants sur la membrane de l'érythrocyte. En effet, le sang se conserve mieux avec l'EDTA qu'avec l'héparine (Miladi, 2005).

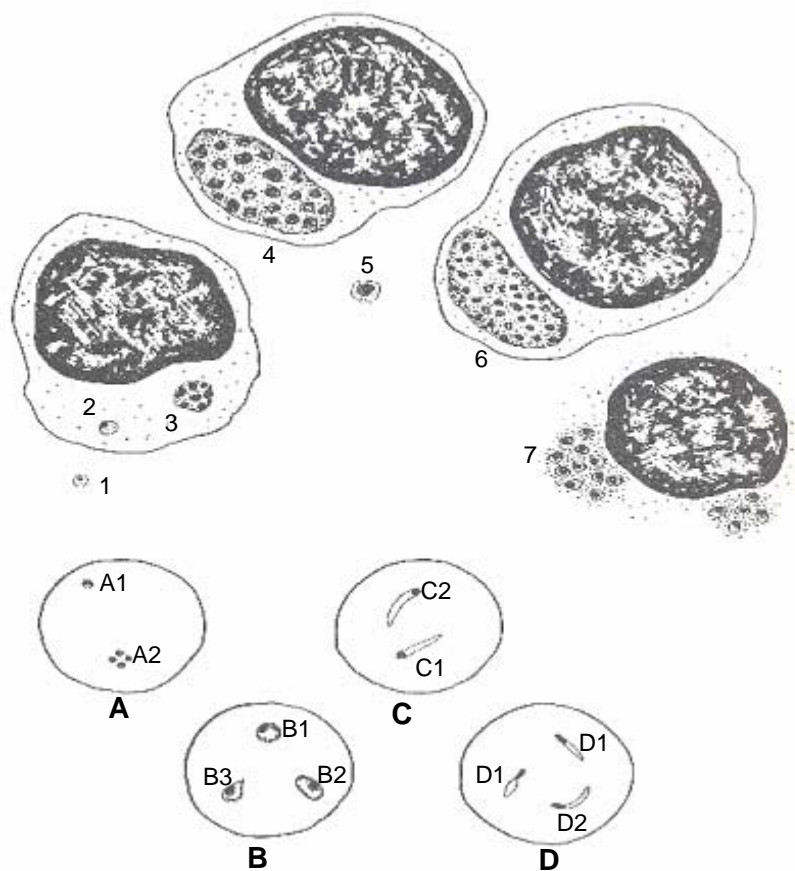
Les formes érythrocytaires de *T. annulata* se présentent sous différents aspects (annulaire, en virgule, en tétrade...) (Figure 3). Les formes ovalaires et annulaires représentent 85 p. cent de la population parasitaire (Tableau IV).

**Tableau IV****Morphologie des formes érythrocytaires de *Theileria annulata***

Forme	Description	Taille	Fréquence
<i>Forme ovulaire</i>	Parfois en poire Cytoplasme bleuté Noyau rouge violacé punctiforme à l'un des pôles de la cellule	2 µm de long	85 %
<i>Forme annulaire</i>	Noyau punctiforme, parfois en croissant	0,5 à 1 µm	
<i>Forme allongée</i>	Forme rectiligne (flamme de bougie) ou curviligne (virgulaire) Noyau punctiforme ou allongé		10 %
<i>Forme anaplasmoïde</i>	Cytoplasme non visible	0,5 µm de diamètre	5 %
<i>Forme en tétrade</i>	4 bourgeonnements cytoplasmiques avec 4 noyaux punctiformes		

Les *Theileria* sont à différencier d'autres pathogènes des érythrocytes tels que les *Babesia* sp. et les *Anaplasma*. Les *Theileria* ne doivent pas être confondues avec les reliquats de noyaux d'érythrocytes (corps de Jolly) ou avec des thrombocytes agrégés (Gharbi et al., 2004). Lorsque les tubes sont à garder au laboratoire, la conservation entre +4 et +8°C assure une meilleure conservation et une meilleure viabilité des parasites que la conservation à température ambiante (Miladi, 2004).

Le diagnostic direct par examen microscopique d'une ponction de nœud lymphatique ou d'un étalement de sang couplé à un examen clinique et aux éléments épidémiologiques est en général le moyen le plus rapide et le moins onéreux pour établir un diagnostic de theilériose tropicale du bœuf (Uilenberg, 2004).



**Figure 3**  
**Morphologie des formes leucocytaires et des formes érythrocytaires de *Theileria annulata* chez le bœuf (Morel, 1981)**

- |    |   |    |   |
|----|---|----|---|
| 1. | Sporozoïte métacyclique infectant libre                 | 5. | Macromérozoïte réinfectant un autre lymphoblaste                        |
| 2. | Trophozoïte dans un lymphoblaste                        | 6. | Microschizonte à petits noyaux (0,3 - 0,8 $\mu\text{m}$ )               |
| 3. | Trophoblaste  | 7. | Micromérozoïte (0,7 - 1 $\mu\text{m}$ ) infectant pour les érythrocytes |
| 4. | Macroschizonte à noyaux moyens (0,2 - 2 $\mu\text{m}$ ) |    |   |
| A. | Trophozoïtes punctiformes à cytoplasme réduit           | C. | Trophozoïtes allongés à chromatine globuleuse                           |
|    | A1. Isolés  |    | C1. Bacilliforme  |
|    | A2. Tétrade   |    | C2. Virgule   |
| B. | Trophozoïtes ramassés                                   | D. | Trophozoïtes allongés à chromatine ovoïde                               |
|    | B1. Circulaire  |    | D1. Bacilliforme  |
|    | B2. Ovale   |    | D2. Virgule   |
|    | B3. Piriforme   |    |   |

### ***La réaction de polymérisation en chaîne***

La réaction de polymérisation en chaîne a été appliquée au diagnostic de la theilériose tropicale, en utilisant des amorces spécifiques, du gène codant pour l'antigène Tams-1 (*Theileria annulata merozoite antigen*) (De Kok et al., 1993 ; d'Olivera et al., 1996 a et b ; d'Olivera et al., 1997 c). La PCR est douée de qualités intrinsèques très intéressantes (sensibilité et spécificité). En effet, une étude réalisée par Ilhan et al. (1998) a montré que cette technique permet la mise en évidence d'un piroplasme dans 4 µl de sang. Néanmoins, la présence d'inhibiteurs de la Taq polymérase peut être à l'origine d'une inhibition de la réaction de polymérisation en chaîne. Cette limite peut être contournée en effectuant une PCR (réaction de polymérisation en chaîne ou « *polymerase chain reaction* ») parallèle amplifiant des gènes spécifiques de l'animal hôte et qui se trouvent dans l'échantillon. Il s'agit par exemple d'une partie du gène de la globine pour les échantillons de sang.

Dans le cas du diagnostic de la theilériose tropicale du bœuf, les résultats obtenus avec cette technique sont à interpréter avec beaucoup de précautions. En effet, la présence du génome du parasite dans différents prélèvements biologiques ne signifie pas que l'animal est malade ou même porteur du parasite. Elle signifie que l'animal a été en contact avec le parasite et aucune autre interprétation plus approfondie ne peut être avancée. Dans le cas où le prélèvement est négatif, ceci ne veut pas dire que l'animal n'a pas rencontré le parasite. Ajouté à son prix qui demeure encore élevé en Tunisie (la technique PCR est facturée à environ 80 DT en Tunisie, 50 €), la PCR reste principalement réservée à la recherche (recherche épidémiologique, vaccinologie, génétique des populations).

### ***La Reverse Line Blot (RLB)***

La RLB est une technique qui se base sur l'amplification de séquences 16s ribosomales conservées et communes aux deux genres *Theileria* et *Babesia*, ainsi qu'aux rickettsies appartenant au groupe *Ehrlichia / Anaplasma*. Cette technique a l'avantage de mettre en évidence tous les pathogènes transmis par les tiques et appartenant à ces taxons (Sparagano et Jongejan, 1999).

L'une des amorces utilisées pour l'amplification génique (PCR) est marquée à la biotine. La région amplifiée est la région V4 qui diffère en fonction de l'espèce de *Theileria* ou de *Babesia*. Une membrane en nylon sur laquelle a été fixée de façon covalente les amorces spécifiques est utilisée puis tournée à 90°, elle est hybridée avec les amplicons dénaturés de la réaction PCR. La membrane est par la suite exposée à un film de rayons X.

La RLB est une technique qui permet la recherche d'acides nucléiques de plusieurs espèces de *Theileria* (*T. annulata*, *T. parva*, *T. taurotragi*, *T. buffeli*, *T. sergenti*, *T. equi*...) et de *Babesia* (*B. bovis*, *B. bigemina*, *B. microti*, *B. cabali*, *B. divergens* ...) et ce au moindre coût. En effet, sur la même membrane il est possible de rechercher plusieurs génomes de parasites sur 40 échantillons différents.

La RLB est une technique spécifique et sensible. En effet, Oura et al., (2004) ont estimé le seuil de détection (déteçtabilité) de la RLB de *T. parva* à une parasitémie de  $4.10^{-5}$ . La déteçtabilité de la RLB est donc légèrement inférieure à celle de la PCR qui est de  $2,7.10^{-5}$  (Oura et al., 2004). Cette technique a l'avantage d'avoir une sensibilité suffisamment bonne pour déteçter les porteurs asymptomatiques (état de portage ou en Anglais : « *carrier state* ») de *T. annulata* et de *T. parva* (Tait et Oura, 2004), mais elle reste inadaptée au diagnostic individuel de cas cliniques.

#### **-VI-4-2- Diagnostic indirect**

Le diagnostic indirect consiste à mettre en évidence les anticorps anti-*Theileria*. Deux techniques peuvent être utilisées : l'immunofluorescence indirecte et l'ELISA.

##### ***Immunofluorescence indirecte (IFI)***

L'IFI est une technique de diagnostic indirect qui permet la mise en évidence d'Ac anti-*Theileria annulata*, elle peut être effectuée avec des antigènes de mérozoïtes ou de schizontes. Darghouth et al. (1996 c) ont comparé les performances intrinsèques du test d'immunofluorescence indirecte et les étalements

sanguins. Ils ont montré que l'IFI est plus performante, ils proposent des seuils de positivité de 1/160 et 1/40 respectivement pour les antigènes de schizontes et les antigènes de formes érythrocytaires. Les mêmes auteurs ont démontré que les valeurs intrinsèques de l'IFI effectuée avec les antigènes schizontes est meilleure que lors d'utilisation de l'antigène érythrocytaire. La sensibilité de l'IFI schizonte est de 88,9 p. cent alors que sa spécificité est de 97 p. cent (Darghouth et al., 2004).

Bien qu'elle soit la technique la plus utilisée pour le dépistage de l'infection à *T. annulata* (OIE, 2005), l'IFI ne représente pas d'intérêt pour le diagnostic clinique du fait de l'apparition tardive des anticorps soit après 3 à 4 semaines de l'infection, mais reste par contre largement utilisée pour le dépistage de l'infection à *T. annulata* (Darghouth et al., 2003).

### ***Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)***

L'ELISA est une technique sérologique quantitative, elle permet la mise en évidence des anticorps anti-*Theileria annulata*. Appliquée à la theilériose tropicale, l'ELISA est douée de caractères intrinsèques qui restent jusqu'à présent inférieurs à ceux de l'IFI. En effet, les Ac ne sont mis en évidence qu'après 3 mois de l'infection. Karagenç (2002) a comparé l'ELISA à l'IFI, elle a démontré que l'ELISA avec l'Ag Tams à une spécificité de 98 p. cent et une sensibilité de 87 p. cent. Lors de l'utilisation de l'Ag SPAG-1, l'ELISA est nettement moins sensible que l'étalement sanguin (Darghouth, données non publiées).

### **-VII- Lutte contre la theilériose tropicale du bœuf**

Du fait de l'importance médicale et économique de la theilériose tropicale du bœuf, la lutte contre cette maladie a été l'une des préoccupations des praticiens et des autorités sanitaires depuis le début du 20ème siècle (Cordier, 1941 ; Sergent et al., 1945).

La lutte contre la theilériose bovine repose sur le traitement et la mise en place de mesures de prophylaxie.

## **-VII-1- Traitement**

La prise en charge thérapeutique d'un bovin atteint de theilériose tropicale du bœuf nécessite le recours à un traitement spécifique theiléricide et un traitement adjuvant :

### ***Le traitement theiléricide***

Actuellement, seules deux molécules theiléricides sont utilisables en pratique. Elles appartiennent à la famille des hydroxynaphtoquinones : la parvaquone et la buparvaquone. La parvaquone (Parvexon ND, Bimeda) surtout active contre le stade schizonte, elle est utilisée à la posologie de 20 mg/kg (Kilani et Bouattour, 1984). La buparvaquone (Butalex ND, Schering-Plough ; Teldex ND, Médivet) est active aussi bien sur les schizontes que sur les formes érythrocytaires de *T. annulata*, elle est administrée à la posologie de 2,5 mg/kg par la voie intramusculaire. Son efficacité est supérieure à celle de la parvaquone, cependant le coût du traitement reste élevé, environ 100 DT/ bovin (62 €). Administrée précocement, la buparavaquone entraîne la guérison de la majorité des animaux dans les formes aiguës, mais reste d'une activité aléatoire sur les formes suraiguës et les formes traitées tardivement et ce, du fait des lésions provoquées par le parasite. En Tunisie, le taux de létalité post-thérapeutique après utilisation de la buparvaquone est d'environ 12 p. cent (Darghouth et Brown, 1994).

### **Le traitement symptomatique**

Il est à ajuster en fonction du cas clinique. Les antibiotiques à large spectre sont fortement indiqués pour prévenir les complications notamment bactériennes. En cas d'hypotonie des réservoirs digestifs l'utilisation d'excito-moteurs permet d'éviter des états d'indigestion parfois létaux. Enfin, la présence d'un état d'inflammation généralisée due notamment aux cytokines pro-inflammatoires justifierait d'évaluer l'intérêt de l'emploi de certains anti-inflammatoires non stéroïdiens comme la flunixin méglumine (Avlezan ND).



## **-VII-2- Prophylaxie**

La prévention de la theilériose tropicale se base sur deux types d'actions : la lutte contre le vecteur et la vaccination des animaux.

### **-VII-2-1- Contrôle du vecteur**

Correctement réalisée, cette mesure permet d'éradiquer la theilériose tropicale dans une étable. Le contrôle du vecteur fait appel à deux grands types de mesures : l'élimination des gîtes présents dans et autour des locaux et l'utilisation d'acaricides sur les animaux.

#### **Elimination des gîtes de tiques dans l'élevage**

C'est une mesure radicale et efficace. Elle permet l'éradication du vecteur ixodidé et donc de la theilériose tropicale de l'étable en question en éliminant l'ensemble des gîtes de ponte et d'hibernation de la tique par un crépissage soigné des façades internes et externes des murs y compris ceux des paddocks. Néanmoins, cette mesure représente un réel investissement que les petits éleveurs qui sont les plus touchés par la theilériose tropicale sont soit incapables de réaliser soit non motivés pour le faire. Dans ces conditions, l'éleveur est le plus souvent contraint de se rabattre sur l'utilisation des acaricides.

#### **Lutte acaricide**

L'utilisation d'acaricides permet de lutter également contre d'autres maladies transmises par les différentes espèces de tiques de bovins tels que les babésioses ou l'anaplasmosse. Plusieurs molécules appartenant à différentes familles d'acaricides peuvent être utilisées, comme les Organophosphorés (diazinon, trichlorfon, phoxim, coumaphos...), les Pyréthriinoïdes de synthèse (deltaméthrine, cyperméthrine, fluméthrine...) et les Formamidines (amitraz) (Bussieras et Chermette, 1991). L'acaricide doit être utilisé selon une stratégie qui dépend de la situation endémique dans laquelle se trouve l'étable (Tableau II) et de la bio-

écologie de la tique vecteur. Dans le cas de *H. detritum*, la lutte acaricide vise à réduire la population du vecteur en coupant le cycle de la tique à deux niveaux, en été lors d'apparition des tiques adultes et en automne durant la période d'activité des juvéniles.

Le traitement d'automne permet de réduire la population de tiques adultes qui apparaîtra au cours de l'été suivant. Il doit être effectué toutes les trois semaines avec un acaricide peu rémanent et donc bon marché.

Le traitement d'été vise les tiques adultes, et permet de limiter immédiatement les risques de transmission de la theilériose. La fréquence des traitements sera à ajuster en fonction de la rémanence de l'acaricide et de l'importance de la population de tiques.

Bien menée, la lutte acaricide permet de réduire efficacement les risques de theilériose, notamment avec le traitement d'automne. Cependant, en pratique l'effectivité de ces traitements acaricides demeure limitée à cause d'une mauvaise observance du protocole par les petits éleveurs tunisiens.

#### **-VII-2-2- La chimioprévention ou méthode d'infection traitement**

C'est une méthode qui est utilisée pour la lutte contre la theilériose de la côte orientale à *T. parva*. Elle consiste à inoculer les bovins avec des broyats de tiques infectées sous le couvert d'un traitement préventif par de l'oxytétracycline longue action administrée par la voie intramusculaire à la posologie de 20 mg/kg de poids vif (Radley, 1981). Dans ces conditions, l'évolution de l'infection se fait sous forme inapparente. Cette méthode d'infection traitement est aussi utilisable avec *T. annulata* (Singh et al., 1993), cependant son intérêt reste faible compte tenu de l'existence de modalités plus simples et plus sûres d'immunisation.

#### **-VII-2-3- La vaccination par des parasites vivants atténués**

Les premiers vaccins vivants atténués contre la theilériose tropicale ont été développés dès 1926 par de Sergent et al. (*in* Sergent et al., 1945) qui ont utilisé

une souche naturellement bénigne de *T. annulata* : la souche Kouba. Ces premiers vaccins étaient produits *in vivo* sur veaux, ce qui entraînait de nombreuses contraintes techniques et sanitaires qui ont abouti à l'abandon de cette approche.

La mise au point de techniques de culture cellulaire permettant la multiplication des cellules leucocytaires infectées de schizontes de *T. annulata* (Tsur-Tchernomorentz, 1945) a rapidement abouti au développement de vaccins vivants atténués par culture à long terme de lignées leucocytaires infectées (Pipano et Tsur, 1966). Administrées aux animaux, les cellules infectées de cultures cellulaires confèrent une immunité solide et durable envers les souches homologues et de façon moindre envers des souches hétérologues (Darghouth et al., 1996 a). En fait, la protection vaccinale s'exprime uniquement contre la maladie mais n'empêche pas l'infection, il s'agit par conséquent d'un vaccin anti-maladie et non d'un vaccin anti-infection. Le nombre de passages nécessaires à l'atténuation est variable en fonction de la souche utilisée, de 100 à 300 passages (Darghouth et al., 1996 a). Les doses inoculées varient considérablement en fonction des auteurs, de  $10^4$  cellules à  $5 \times 10^5$  cellules infectées (Darghouth et al., 2003). La durée de la protection vaccinale est mal établie, cependant elle serait probablement supérieure à une année, comme l'indiquent des observations réalisées en Tunisie (Darghouth et al., 2004) et en ex-URSS (Zablotsky et al., 1991). Cependant, et malgré leur efficacité en conditions de terrain, l'immunité conférée par les vaccins envers des infections d'épreuve hétérologues décroît sensiblement avec le temps (Darghouth, 2000). Après culture en masse sur milieu RPMI, les doses de vaccins sont stockées dans de l'azote liquide, puis décongelées au moment de leur utilisation. Ce procédé de routage est à l'origine d'un surcoût de 30 p. cent (Bouslikhane et al., 1998) et peut affecter l'efficacité de la vaccination lors de décongélation en conditions de terrain.

Ces vaccins représentent actuellement le seul moyen d'immunisation contre la theilériose tropicale. Quelques pays (Israël, la Turquie, l'Iran, la Russie et l'Inde) utilisent régulièrement à large échelle les vaccins vivants atténués (Hashemi-Fesharki, 1988 ; Stepanova et Zablotskii, 1989 ; Singh et al., 1993 ; Pipano, 1995).

L'atténuation de *T. annulata* au laboratoire est techniquement simple, cependant le développement de vaccins vivants atténués destinés à être utilisés

sur le terrain doit répondre à des impératifs épidémiologiques et à des critères d'innocuité spécifiques au terrain ciblé (Darghouth et al., 2003) : (i) adaptation du niveau d'atténuation aux animaux ciblés par la vaccination, (ii) durée de l'immunité vaccinale couvrant au moins une saison de theilériose, (iii) absence de transmission du parasite vaccinal aux tiques. A partir des années 90, Darghouth et collaborateurs, ont testé au Laboratoire de Parasitologie (Ecole Nationale de Médecine Vétérinaire de Sidi Thabet, Tunisie) plusieurs souches candidates tunisiennes de *Theileria*, la souche Béja au passage 280 a été retenue comme un candidat vaccinal (Darghouth et al., 1996 a) sur la base des critères suivants : bonne innocuité pour les vaches laitières de race pure jusqu'au 6<sup>ème</sup> mois de gestation, absence de transmission aux tiques, durée suffisante de l'immunité vaccinale. Un nouveau procédé de routage de vaccins vivants atténués sans chaîne de froid a été développé. Le vaccin est décongelé à la demande en conditions maîtrisées sur le site de production, et pourra être utilisé dans les 4 à 6 jours suivants en étant conservé à température ambiante (Darghouth, données non publiées).

Les mécanismes conduisant à l'atténuation sont restés pendant plusieurs années totalement inconnus malgré l'utilisation de ces vaccins sur le terrain. Plusieurs auteurs ont étudié les aspects génétiques, biologiques et immunologiques de l'atténuation, ces travaux ont montré que l'atténuation est un phénomène complexe multifactoriel associé aux modifications parasitaires suivantes :

### ***Rôle des matrices métalloprotéinases***

Ces enzymes interviennent dans le pouvoir métastatique de clones de leucocytes infectés par *T. annulata*, comme démontré dans des essais réalisés sur les souris SCID (Somerville et al., 1998). L'atténuation est suivie d'une réduction importante voire d'une disparition de la production de métalloprotéinases (Hall et al., 1999).

### ***Restriction du polymorphisme parasitaire et de la diversité antigénique***

Plusieurs études sur le polymorphisme génétique et enzymatique de lignées atténuées de *T. annulata* ont montré une restriction importante du polymorphisme avec apparition d'une population unique à caractère clonal (Baylis et al., 1992 ; Darghouth et al., 1996 a ; Sutherland et al., 1996). L'utilisation d'anticorps

monoclonaux spécifiques d'antigènes parasitaires a montré une réduction évidente de la diversité antigénique évoluant vers la présence d'un seul type antigénique exclusif ou dominant (Sutherland et al., 1996 ; Darghouth, 2000).

### ***Apparition d'altérations géniques et modification de l'expression différentielle de gènes***

Hall et al. (1999) ont observé que plusieurs souches atténuées de *T. annulata* ont soit perdu le gène SPAG-1, soit présenté des mutations sur les séquences reconnues par les amplicons conduisant à la disparition des sites de restriction chez 3 des 4 souches vaccinales étudiées. Il s'agit de deux vaccins issus de la souche Ode (Inde) et une de la souche Diaybakir (Turquie).

### ***Altération de la différenciation en mérozoïtes***

Le pourcentage de microschantons produits par les souches atténuées est significativement inférieur à celui des souches parentales et ce, aussi bien *in vivo* qu'*in vitro*, en utilisant la différenciation des schizontes en mérozoïtes (Shiels, 1999).

### ***Réduction de la production de cytokines pro-inflammatoires***

Graham et al. (2001) ont montré que l'infection de bovins par des clones à faible potentiel d'induction de cytokines pro – inflammatoires (IL1-alpha, IL1-béta, IL6, TNF alpha) détermine l'évolution d'une theilériose asymptomatique alors que l'utilisation de clones à potentiel élevé de production de ces cytokines conduit à l'apparition de signes cliniques de theilériose.

En définitive, l'atténuation par culture à long terme est très certainement conditionnée par la réduction de l'expression des facteurs de virulence ou leur disparition de sorte que globalement, leur niveau de persistance après atténuation soit en deçà des seuils compatibles avec l'induction de la maladie (Hall et al., 1999).

## **-VII-2-4- Perspectives d'optimisation de la vaccination contre la theilériose tropicale : les vaccins sous-unitaires contre *Theileria annulata***

Malgré leur efficacité, les vaccins à base de cultures cellulaires souffrent de certaines contraintes techniques qui limitent leur utilisation : (i) risque de

contaminations accidentelles en cours de production industrielle, par des bactéries ou des virus pathogènes, (ii) nécessité d'une chaîne de froid depuis le site de production jusqu'à la ferme, (iii) la présence d'une réexpression de virulence après transmission expérimentale aux tiques (Darghouth, 2000).

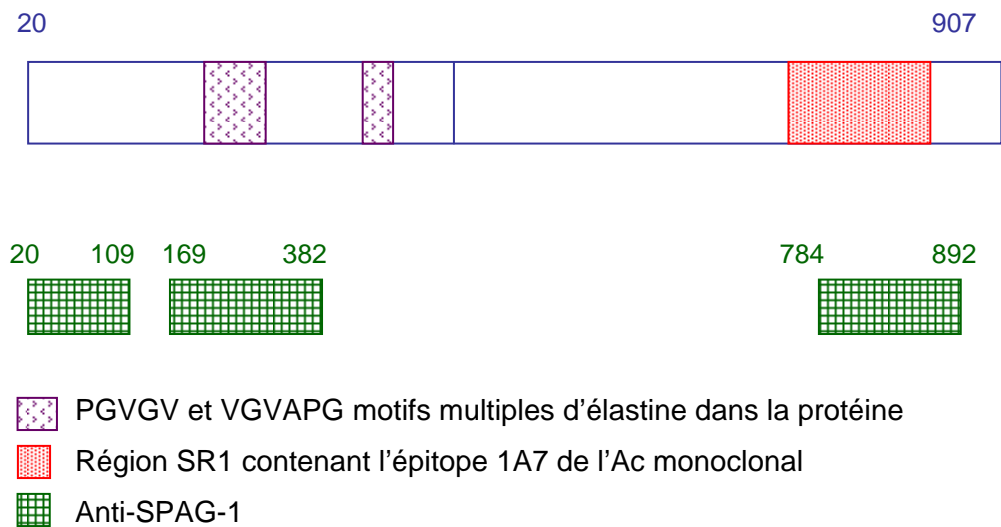
Dans ce contexte, les recherches se sont logiquement orientées vers l'identification d'antigènes protecteurs pouvant servir de base au développement de vaccins inactivés recombinants. Plusieurs antigènes de *T. annulata* ont été isolés puis identifiés et pour certains produits sous formes recombinantes (Williamson et al., 1989 ; d'Oliviera et al., 1997 a et c ; Boulter et al., 1999 ; Boulter et Hall, 2000 ; Darghouth et al., soumis pour publication). Cependant à ce jour, seuls 2 antigènes parasites ont fait l'objet d'essai de vaccination, il s'agit de l'antigène de sporozoïtes, le SPAG-1 et d'un antigène de rhoptries présents chez le stade mérozoïte de *T. annulata*, le Tams.

### ***Immunisation avec le SPAG-1***

L'antigène SPAG-1 est une protéine comportant 907 résidus, d'un poids moléculaire de 91,9 kD (Boulter et Hall, 2000) exprimée à la surface des sporozoïtes. Il comporte trois régions immuno-dominantes qui sont reconnues par les Ac monoclonaux anti-SPAG-1. Il s'agit de deux régions se trouvant à l'extrémité N terminale et la région C terminale (SR1) qui a été utilisée dans des essais d'immunisation.

L'utilisation du SPAG-1 comme candidat vaccinal vise à induire une réponse humorale capable de neutraliser une partie des sporozoïtes de *T. annulata* et de limiter la sévérité de l'infection. Les essais de vaccination utilisant le SPAG-1 ont tous montré l'expression d'une immunité relative contre des challenge homologues (Boulter et al., 1998) ou hétérologue (Darghouth et al., soumis pour publication).

Les meilleurs niveaux de protection ont été obtenus en utilisant l'Ag SPAG-1 avec l'adjuvant RWL comme l'indique la survie de trois des six animaux vaccinés alors que les 12 animaux du groupe témoin sont tous morts ainsi que l'augmentation de la période prépatente et de la période d'incubation.



**Figure 4**  
**Structure de l'antigène SPAG-1 de *Theileria annulata* et motifs reconnus par l'anticorps anti-SPAG-1** (Knight et al., 1996)  
 Les numéros sur les boîtes réfèrent aux résidus des acides aminés

### ***Immunisation avec le Tams***

L'antigène Tams est exprimé par les stades mérozoïtes ainsi que les formes érythrocytaires de *T. annulata* (Glascodine et al., 1990). Il se présente sous deux formes alléliques : le Tams 1-1 et le Tams 1-2. Ces deux allèles expriment deux protéines d'un poids moléculaire respectif de 30 et 32 kD. Le gène Tams présente une grande variabilité antigénique et une diversité des résidus d'acides aminés (Gubbels et al., 2001).

L'antigène Tams a été utilisé dans 2 essais vaccinaux utilisant la protéine recombinante en présence d'adjuvant (d'Oliveira et al., 1997 a et c ; Boulter et al., 1998).

Ces essais ont montré que l'administration de la protéine Tams recombinante associée à l'adjuvant ISCOM, induit une protection relative contre une infection d'épreuve par des sporozoïtes homologues.

***Association d'antigènes de différents stades et intérêt de la vaccination par emploi d'ADN parasitaire et de vaccins vivants recombinants hétérologues***

L'amélioration de la réponse humorale notamment avec l'Ag SPAG-1 en utilisant des adjuvants appropriés a abouti somme toute à une amélioration relative de la protection (Hall et al., 2002) démontrant ainsi les limites de la réponse humorale. Par conséquent, l'optimisation de la protection conférée par les vaccins sous-unitaires dépend d'une part, de l'association de molécules des différents stades du parasite, et d'autre part, de l'utilisation de nouveaux protocoles de routage capables d'induire une réponse aussi bien humorale que cellulaire et donc utilisable dans un vaccin multi-stades ciblant différents effecteurs immunitaires.

*Association d'antigènes de stades distincts*

Boulter et al. (1998) ont immunisé des animaux avec l'association Tams/SPAG-1, les résultats obtenus ne semblent pas indiquer la présence d'une amélioration significative de la protection par cette association malgré l'absence de cas de mortalité et une réduction importante de la parasitémie. Plus récemment, Darghouth et al. (soumis pour publication) ont associé le SPAG-1 adjuvé de Montanide à une lignée parasitaire atténuée de *T. annulata*. Cette association a induit une amélioration spectaculaire de la protection envers une infection d'épreuve hétérologue traduisant la présence d'une synergie entre les 2 vaccins.

*Les vaccins vivants atténués recombinants hétérologues, vaccination par ADN*

Un vaccin vivant recombinant hétérologue est composé de micro-organisme vivant, dans son génome a été insérée une séquence d'ADN étranger et qu'il aura à exprimer de manière constitutive lorsqu'il est injecté au sujet à vacciner. Cette approche a été développée compte tenu de l'amélioration de la présentation de l'antigène par le microorganisme recombinant utilisé. A l'heure actuelle, quatre vecteurs ont fait l'objet d'essais de vaccination : les salmonelles, les adénovirus, le virus de la vaccine et le Bacille de Calmette et Guérin (BCG). Les essais de d'Oliveira et al. (1997 a et c) ont montré que la vaccination par des *Salmonella* Typhimurium recombinantes exprimant le gène Tams de *T. annulata* n'induit pas de protection contre une infection d'épreuve par des parasites homologues.



### *Les vaccins à ADN ou immunisation génique*

La vaccination à base d'ADN repose sur l'administration de vecteur d'expression eucaryote au sujet vacciné qui va donc permettre l'expression du gène d'intérêt chez le sujet immunisé. Le plasmide administré doit parvenir au compartiment nucléaire du sujet transfecté, le gène d'intérêt sera ainsi transcrit en ARNm puis traduit en protéine. Cette protéine sera présentée au système immunitaire pour induire une réponse immune spécifique.

La vaccination à base d'ADN est actuellement au stade d'essai chez l'homme, elle concerne plusieurs maladies : SIDA, Hépatite B, Paludisme, la leishmaniose à *L. major*, les infections par l'Herpes Virus, la rage et même certaines maladies cancéreuses (Bahloul et al., 2003 ; Ben Hadj Ahmed et al., 2004 ; Xing et al., 2005). Malgré le fait que les vaccins à ADN sont très prometteurs, aucun n'a encore atteint le stade de commercialisation (Bahloul et al., 2003). Les essais de d'Oliveira et al. (1997 a et c) ont montré que la vaccination par des plasmides incorporant des séquences d'ADN codant pour le gène Tams induit une protection relative contre une infection d'épreuve homologe démontrant ainsi l'intérêt de cette approche dans l'immunisation contre la theilériose.

Le vaccin à ADN le plus fréquemment essayé à l'heure actuelle se base sur l'utilisation de plasmides. L'administration de ces vaccins induit une réponse immune de deux types :

- La libération de cytokines pro-inflammatoires (IL12, IFN gamma, TNF alpha) et une stimulation clonale des cellules NK. En effet, il a été démontré que les séquences palindromiques appelées ISS « *immunostimulatory Sequences* » composées de motifs CG, de l'ADN sont douées de propriétés immuno-modulatrices. Le système immunitaire de vertébrés reconnaît des dinucléotides non méthylés CpG (Cytosine-phosphate-guanosine) flanqués par des motifs de bases spécifiques dans l'ADN bactérien comme étant un danger et conduit à la mise en place d'une réponse immune innée de type Th1 aussi bien chez les ovins que chez les bovins (Nichani et al., 2004). Cet environnement particulier en cytokines influe sur la polarisation de la réponse immune spécifique.

- Réponse immune spécifique consécutive à l'expression de l'antigène : qui varie en fonction des cellules transfectées et donc en fonction de la voie d'administration. Par exemple, l'immunisation par la voie dermique oriente la réponse immune vers l'isotype Th1 avec apparition d'une réponse T CD8<sup>+</sup>, par contre, la voie intramusculaire oriente la réponse immune vers l'isotype Th2 (revue par Huygen, 2005).

Les vaccins à ADN peuvent être inoculés par différentes voies, sous-cutanée, intramusculaire et intradermique.

Pertmer et al. (1996) montrent que l'immunisation de souris Balb/C contre la grippe aviaire par la voie intramusculaire et la voie intradermique par le « *gene gun* » offrent la même immunité post-vaccinale. Néanmoins, la quantité d'Ag nécessaire par la voie intradermique est 100 fois plus faible que la voie intramusculaire. Même si les titres en Ac sont les mêmes, la quantité d'isotypes est différente. Ainsi, la voie intramusculaire est suivie par la synthèse de titres élevés en IgG<sub>2a</sub> et des titres plus faibles en IgG<sub>1</sub>.

Un essai comparatif de vaccination avec un cocktail d'antigènes de *Leishmania major* (LmST1 1, TSA et LACK pour *Leishmania* homologue of receptors for activated C kinase) a été réalisé par Méndez et al. (2002). Trois voies ont été comparées : la voie intramusculaire, sous-cutanée et intradermique, cette dernière confère une immunité comparable avec des quantités d'Ag 5 fois moins importantes.

En effet, le derme contient des cellules présentatrices de l'Ag (CPA) tels que les cellules de Langhans et les dendrocytes dermiques, ces cellules sont directement transfectées lors de l'injection intradermique d'ADN (*in* Méndez et al., 2002).

#### *Approche d'immunisation par le « prime-boost » hétérologue*

La vaccination génique confère une immunité qui reste partielle, il est alors impératif de l'améliorer pour atteindre des seuils permettant de protéger les sujets vaccinés de manière satisfaisante.

Le « *prime-boost* » hétérologue représente actuellement une des voies les plus prometteuses pour accroître l'efficacité de l'immunisation. L'approche du « *prime-boost* » hétérologue consiste à injecter en primo-vaccination de l'ADN et de faire un rappel avec un virus recombinant pour le gène de l'antigène vaccinal. Il

s'agit soit du virus MVA « *Modified vaccinia Virus Ankara* » soit le virus de la variole aviaire « *Fowlpox virus* » soit un *Adenovirus* (Ramshaw et Ramsay, 2000 ; Gilbert et al., 2005). Le MVA a été un des virus les plus utilisés dans cette approche vaccinale. Cette souche virale a été isolée à partir de lésions cutanées sur un cheval à Ankara (Turquie). Elle a subi 500 passages successifs sur des cellules de fibroblastes d'embryon de poulet « *chick embryo fibroblasts* » ce qui a provoqué une délétion d'un fragment d'ADN de 31 kb (Blanchard et al., 1998). Le MVA se réplique de manière très limitée, il n'exprime pas de protéines solubles qui peuvent se lier à l'IFN  $\gamma$ , à l'IFN  $\alpha/\beta$ , au TNF et au CC chemokines. Néanmoins, ce virus induit la production de récepteur à l'interleukine-1 $\beta$ . Par conséquent, il a un bon pouvoir immunogène malgré son faible pouvoir réplcatif chez les mammifères (Drexler et al., 1998). En effet, ce virus a même été testé sur plus de 120.000 personnes pour la vaccination contre la variole en Allemagne et en Turquie sans pour autant que les personnes vaccinées ne manifestent d'effets secondaires (Abaitua et al., 2005).

Sur le plan immunologique, la vaccination contre différents agents pathogènes viraux ou parasitaires avec l'approche de « *prime-boost* » hétérologue confère une immunité à médiation cellulaire et humorale solides avec notamment une activation des cellules T mémoires (Ramshaw et Ramsay, 2000) et des lymphocytes B. L'activation des réponses CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> est essentielle dans l'approche « *prime-boost* » puisque la réponse optimale de type CD8<sup>+</sup> mémoire nécessite l'intervention d'une activation de cellules CD4<sup>+</sup> auxiliaire (Woodland, 2004). Cette immunité est également consolidée par les motifs répétés CpG plasmidiques qui stimulent fortement la production d'IL 12 (Ramshaw et Ramsay, 2000).

Il a été établi que la stratégie de « *prime-boost* » permet d'avoir des effets additifs qui deviennent synergiques si le rappel est effectué avec un Poxvirus ou un Adenovirus (Woodland, 2004). L'ADN a d'excellentes propriétés de *priming* notamment d'une réponse T CD8<sup>+</sup> (mais de mauvaises propriétés de *boosting*), par contre les virus recombinants possèdent une excellente propriété de *boosting* (Woodland, 2004).

L'approche « *prime-boost* » a été utilisée avec succès chez des mammifères supérieurs. Des chiens vaccinés avec l'antigène LACK (*Leishmania homologue of receptors for activated C kinase*) en utilisant comme primo-vaccination l'ADN LACK et comme rappel le virus de la vaccine recombinant et exprimant la protéine LACK

ont obtenu des résultats encourageants. En effet, trois des cinq chiens immunisés n'ont pas été infectés et quatre n'ont pas présenté de symptômes (Ramiro et al., 2003).

L'amélioration du pouvoir immunogène des vaccins à ADN peut être apportée par plusieurs voies de recherche : (i) un meilleur choix des Ag parasitaires en fonction des voies effectrices recherchées (CD4+ *versus* CD8+, Th1 *versus* Th2 et Tc1 *versus* Tc2) (Woodland, 2004), (ii) l'utilisation de constructions multi-épitopes associant plusieurs antigènes ce qui permettrait d'obtenir un effet synergique, (iii) l'amélioration de la présentation des Ag en utilisant des motifs CpG qui induisent une immunité non spécifique (Nichani et al., 2004), (iv) enfin, le choix des voies d'administration, ainsi que le nombre d'injections et l'intervalle à observer entre les injections. En effet, ces variables influent de manière capitale sur la réponse immune post-vaccinale (Méndez et al., 2002 ; Nicholas et al., 2003).

En définitive, la vaccination par ADN apparaît comme une alternative séduisante de recherche dans la theilériose tropicale compte tenu de sa capacité à induire d'une part la stimulation de réponses lymphocytaires jouant un rôle essentiel dans la protection contre l'infection, et d'autre part d'anticorps ciblant les stades parasites libres.

#### **-VII-2-5- Stratégie de lutte contre la theilériose tropicale en Tunisie**

La lutte contre la theilériose tropicale en Tunisie (et partout où la maladie sévit) doit être menée selon une stratégie globale : (i) intégrant les différentes mesures de lutte détaillées plus haut, suivant une approche économique coût-bénéfice, (ii) visant à moyen terme à atteindre l'éradication de la maladie, étant donné les pertes importantes provoquées par l'état de portage asymptomatique, (iii) tenant compte des particularités de chaque état endémique comme détaillé au Tableau V, (iv) intégrant un volet de vulgarisation compte tenu de la perception erronée de la transmission de la theilériose par les éleveurs à risque de maladie (Chaari, 2004 ; Karoui, 2005 ; Mansour, 2005).

**Tableau V**  
**Mesures de lutte raisonnée contre la theilériose tropicale en fonction de l'état**  
**endémique de l'élevage (Darghouth et al., 2003)**

<b>Etat endémique</b>	<b>Acaricides contre les adultes</b>	<b>Acaricides contre les nymphes</b>	<b>Utilisation du vaccin vivant atténué</b>
<i>Endémie stable</i>	Animaux de plus d'une saison estivale : durant le pic d'activité	Proscrits sauf éradication	- Veaux - Nouveaux venus
<i>Endémie instable modérée</i>	Durant le pic d'activité	Proscrits sauf éradication	- Animaux jusqu'au troisième été - Nouveaux venus
<i>Endémie instable élevée</i>	Durant la saison d'activité	Indiqués	Indiqué

En Tunisie, cette approche globale de lutte devra s'insérer dans le cadre d'un programme de mise à niveau progressif des constructions dans les petites et moyenne étables (Darghouth et al., 2004). Ce programme pourra progressivement conduire à éradiquer la tique vecteur, à améliorer les conditions générales d'élevage et contribue ainsi à lutter contre d'autres maladies d'élevage comme les mammites, les métrites... Dans ce contexte, la vaccination associée à des traitements acaricides des animaux devra représenter une mesure d'accompagnement pour protéger les catégories de bovins à risque notamment lors de passage par des niveaux d'instabilité endémique consécutifs à la réduction progressive de la population de tiques vecteurs.

Dans ce contexte, l'utilisation des vaccins vivants atténués pourra être améliorée par l'évaluation du bénéfice économique apporté par la vaccination dans les différents états endémiques de theilériose tropicale. Cette approche permettra, d'une part de mieux préciser la pertinence économique de ces vaccins et d'autre part, de mieux diriger les efforts de recherche vers le développement de vaccins sous-unitaires en fournissant un référentiel essentiel (intérêt économique de la vaccination). Par ailleurs, le développement des recherches immunologiques sur la vaccination des grandes maladies d'importance médicale et vétérinaire notamment le nouveau routage des vaccins et la progression des connaissances spécifiques au protozoaire *T. annulata* ouvre de nouvelles perspectives dans la recherche de nouveaux vaccins sous-unitaires contre la theilériose tropicale.

## Références

- [1] Abaitua F., Rodriguez J.R., Garzon A., Rodriguez D., Esteban M. 2005. Improving recombinant MVA immune responses: Potentiation of the immune responses to HIV-1 with MVA and DNA vectors expressing Env and the cytokines IL-12 and FN-gamma. *Virus Res.*, 2005 (in press).
- [2] Bahloul C., Ben Hadj Ahmed S., B'chir B.I., Kharmachi H., Hayouni E.A., Dellagi K. 2003. Post-exposure therapy in mice against experimental rabies: a single injection of DNA vaccine is as effective as five injections of cell culture-derived vaccine. *Vaccine*, 177-184.
- [3] Bahri S., Kallel A., Gouia A. 1995. La theilériose bovine en Tunisie, enquête rétrospective sur cinq années. *Bull. Epidémiol. Inform. Vét. Instit. Rech. Vét. Tun.*, 5 : 1 – 3.
- [4] Baylis H.A., Megson A., Brown C.G.D., Wilkie G., Hall R. 1992. *Theileria annulata*-infected cell lines produces abundant proteases whose activity is reduced by long term cell culture. *Parasitol.*, 105: 417-423.
- [5] Ben Hadj Ahmed S., Bahloul C., Robbana C., Askri S., Dellagi K., 2004. A comparative evaluation of the DNA vaccine candidates against experimental murine leishmaniasis due to *L. major*. *Vaccine*, 1631-1639.
- [6] Ben Miled L. 1994. Population diversity in *Theileria annulata* in Tunisia. PhD thesis, University of Edinburgh. 252 pp.
- [7] Blanchard T.J., Alcamì A., Andrea P., Smith G.L. 1998. Modified vaccinia virus Ankara undergoes limited replication in human cells and lacks several immunomodulatory proteins: implications for uses as a human vaccine. *J. Gen. Virol.*, 79 : 1159-1167.

- [8] Bouattour A. 1996. Etude des tiques des bovins dans la région de Sidi Thabet : leur rôle dans la transmission de la theilériose. Diplôme d'études approfondies en écologie animale. Faculté des sciences de Tunis, Tunisie. 62 pp.
- [9] Bouattour A. 2001. Les tiques en Tunisie : rôle de *Hyalomma detritum* dans la transmission de *Theileria annulata*. Thèse ès Sciences biologiques. Faculté des Sciences de Tunis. 247 pp.
- [10] Bouattour A., Darghouth M.A., Ben Miled L. 1996. Cattle infestation by *Hyalomma detritum* ticks and prevalence of *Theileria* in *Hyalomma detritum* species in Tunisia. *Vet. Parasitol.*, 65 : 256-263.
- [11] Bouattour A., Darghouth M.A., Daoued A. 1999. Distribution and ecology of ticks (Acari, Ixodidae) infesting livestock in Tunisia. An overview of results of 8 years field collection. *Parassitologia*, 41, (suppl. 1), 33-36.
- [12] Boulter N., Brown D., Wilkie G., Williamson S., Kirvar E., Knight P., Glass E., Campbell J., Morzaria S., Nene V., Musoke A., d'Oliveira C., Gubbels M.J., Jongejan F., Hall R. 1999. Evaluation of recombinant sporozoite antigen SPAG-1 as a vaccine candidate against *Theileria annulata* by the use of different delivery systems. *Trop. Med. Int. Health.*, 4 (9) : A71-7.
- [13] Boulter N., Hall R. 2000. Immunity and vaccine development in the bovine theileriosis. *Advances in Parasitol.*, 44 : 41 – 97.
- [14] Boulter N.R., Brown C.G., Kirvar E., Glass E., Campbell J., Morzaria S., Nene V., Musoke A., d'Oliveira C., Gubbels M.J., Jongejan F., Hall F.R. 1998. Different vaccine strategies used to protect against *Theileria annulata*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 849 : 234-46.
- [15] Bouslikhane M., Kachani M., Ouhelli M. 1998. La theilériose bovine au Maroc, investigations épidémiologiques et étude de l'impact sur la productivité des élevages. Résumé de communication orale, 15 ème congrès vétérinaire maghrébin, Hammamet, Tunisie, 5 - 6 mai 1998.
- [16] Brown C.G.D. 1990. Control of tropical theileriosis (*Theileria annulata* infection of cattle). *Parassitologia*, 32: 23-31.
- [17] Bussieras J., Chermette R. 1991. Parasitologie vétérinaire. Entomologie. Ed. Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort. 163 pp.
- [18] Chaari S. 2004. Enquête sur la theilériose tropicale dans la basse vallée de la Medjerda : perception de la maladie et application de la lutte acaricide.

Mémoire pour l'obtention du Diplôme d'Etudes Supérieures Spécialisée en Epidémiologie Animale. Ecole Nationale de Médecine Vétérinaire de Sidi Thabet, 27 pp.

- [19] Conze G., Campbell J.D., Nichani A.K., Glass E.J., Spooner R.L., Ahmed J.S. 1998. Evidence for strain specificity in cytotoxic T-lymphocyte-mediated, major histocompatibility complex class I-dependent killing of *Theileria annulata*-infected cells. *Parasitol Res.*, 84 : 593-5.
- [20] Cordier G. 1941. Des fléaux de nos vacheries : les tiques et les piroplasmoses. Office de l'expérimentation et de la vulgarisation agricoles. Tunis. 26 pp.
- [21] Cordier G., Menager J. 1940. Huit années de prémunition anti-piroplasmique en Tunisie. Ed. Service de l'élevage de Tunis. 31 pp.
- [22] d'Oliveira C. 1997. *Theileria annulata* : recombinant vaccine development and molecular identification. Université d'Utrecht. PhD. 120 pp.
- [23] d'Oliveira C., Feenstra A., Vos H., Osterhaus A.D.M.E., Sheils B.R., Cornelissen A.W.C.A., Jongejan F. 1997 (c.) Induction of protective immunity to *Theileria annulata* using two major merozoite antigens presented in different delivery systems. *Vaccine*. 15 : 1796-1804.
- [24] d'Oliveira C., Tijhaar E.J., Sheils B.R., Van Der Weide M., Jongejan F. 1996 (a). Expression of genes encoding two major *Theileria annulata* merozoite surface antigens in *Escherichia coli* and a *Salmonella* Typhimurium aro A vaccine strains. *Gene*, 172 : 33 - 39.
- [25] d'Oliveira C., Van Der Weide M., Habel M.A., Jacquiet P., Jongejan F. 1996 (b). Detection of *Theileria annulata* in blood samples of carrier cattle by PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 33 : 2665 – 2669.
- [26] d'Oliveira C., Van Der Weide M., Jacquiet P., Jongejan F. 1997 (a). Detection of *Theileria annulata* by PCR in ticks (Acari : Ixodidae) collected from cattle in Mauritania. *Exp. Appl. Acarol.*, 21 : 279-291.
- [27] Darghouth M.A., Kilani M., Bouattour A. 2003. Les theilérioses. In : Les maladies infectieuses et parasitaires du bétail des régions chaudes, Editeurs Lefèvre P.C., Provost A. et Blancou J. Ed. Masson, Paris.
- [28] Darghouth M.A. 2000. La theilériose tropicale des bovins (*Theileria annulata*) en Tunisie : Caractérisation des états d'endémie et développement de lignées



leucocytaires infectées de schizontes atténués. Thèse de troisième cycle. Institut Polytechnique de Toulouse. 242 pp.

- [29] Darghouth M.A. 2004. Prévention de la theilériose tropicale en Tunisie : lutte acaricide et vaccination. Comptes rendus des 11 èmes journées de l'institution de la recherche et de l'enseignement supérieur agricoles. 18 et 19 Décembre 2004, Hammamet, Tunisie.
- [30] Darghouth M.A., Ben Miled L., Bouattour A., Melrose T.R., Brown C.G.D., Kilani M. 1996 (a). A preliminary study of the attenuation of Tunisian schizont-infected cell lines of *Theileria annulata*. Parasitol. Res., 82 : 647-655.
- [31] Darghouth M.A., Bouattour A., Ben Miled L., Kilani M., Brown C.G.D. 1996 (b). Epidemiology of tropical theileriosis (*Theileria annulata* infection of cattle) in an endemic region of Tunisia: characterisation of endemicity states. Vet. Parasitol., 65 : 199-211.
- [32] Darghouth M.A., Bouattour A., Ben Miled L., Sassi L. 1996 (c). Diagnosis of *Theileria annulata* infection of cattle in Tunisia : comparison of serology and blood smears. Vet. Res., 27 : 613 – 621.
- [33] Darghouth M.A., Bouattour A., Kilani M. 1999. Tropical theileriosis in Tunisia : epidemiology and control. Parasitologia, 41 (Suppl. 1) : 33 – 36.
- [34] . Darghouth M.A., Bouattour A., Kilani M., Preston P.M. 2006. Theileriosis. Ed. Lavoisier, France. Sous presse
- [35] Darghouth M.A., Boulter N., Gharbi M., Tait A., Hall R. Vaccination of calves with an attenuated cell line of *Theileria annulata* and the sporozoite antigen SPAG-1 produces synergistic effect. Soumis pour publication.
- [36] Darghouth M.A., Brown C.G.D. 1994. Final report of the project STD2/106/1049 : Epidemiological investigation on tropical theileriosis in Tunisia, with relevance to the development of a live attenuated vaccine.
- [37] Darghouth M.A., Limam S., Gharbi M., Soudani C., Karoui M., Krichi A. 2004. Detection of natural infections with *Theileria annulata* on calves at first theileriosis season: comparison of the indirect fluorescent antibody test (IFAT) and blood smears. Arch. Instit. Pasteur de Tunis, 1,2,3, et 4 : 41-46.
- [38] De Kok J.B., d'Oliveira C., Jongejan F. 1993. Detection of protozoan parasite *Theileria annulata* in *Hyalomma* ticks by the polymerase chain reaction. Ex. Appl. Acarol., 17 : 839 – 846.

- [39] Dobbelaere D.A.E., Rottenberg S. 2003. *Theileria*-induced leukocyte transformation. *Current Opinion in Microbiol.*, 6 : 377-382.
- [40] Drexler I., Heller K., Wahren B., Erfle V., Sutter G. 1998. Highly attenuated modified vaccinia virus Ankara replicated baby hamster kidney cells, a potential host for virus propagation, but not in various human transformed primary cells. *J. Gen. Virol.*, 79 : 347-352.
- [41] Dshunkovsky E., Luhs J. 1904. Die piroplasmosen der rinder. *Central Blatt fur Bakteriologie*, 35 : 486-492.
- [42] El Fourgi M., Sornicle J. 1967. Epizootologie et prophylaxie de la theilériose bovine en Tunisie. *Bull. Off. Int. Epizoot.*, 58, 151-163.
- [43] Felquate D.M., Heaney S., Webster R., Robinson H.L. 1997. Different T helper Cell types and antibody isotypes generated by saline and gene gun DNA immunization. *J. Immunol.*, 158 : 2278-2284.
- [44] Gharbi M., Darghouth M.A., Uilenberg G. 2004. Etalements sanguins colorés au Giemsa : aspects pratiques. Ed. Ecole Nationale de Médecine Vétérinaire de Sidi Thabet, Tunisie. 8 pp.
- [45] Gilbert S.C., Moorthy V.S., Andrews L., Pathan A.A., McConkey S.J., Vuola J.M., Keating S.M., Berthoud T., Webster D., McShane H., Hill A.V. 2005. Synergistic DNA-MVA prime-boost vaccination regimes for malaria and tuberculosis. *Vaccine*. Sous presse.
- [46] Glascodine J., Tetley L., Brown D., Shiels B. 1990. Development expression of a *Theileria annulata* merozoite surface antigen. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 40 : 105-112.
- [47] Glass E.J. 2001. The balance between protective immunity and pathogenesis in tropical theileriosis: what we need to know to design effective vaccines for the future. *Res Vet Sci.*, 70 : 71-5.
- [48] Glass E.J., Innes E.A., Spooner R.L., Brown C.G.D. 2002. Infection of bovine monocyte macrophage populations with *Theileria annulata* and *Theileria parva*. *Vet Immunol. Immunopathol.*, 22 : 355-358.
- [49] Glass E.J., Craigmile S.C., Springbett A., Preston P.M., Kirvar E., Wilkie G.M., Eckersall P.D., Hall F.R., Brown C.G.D. 2003. The protozoan parasite, *Theileria annulata*, induce a distinct acute phase proteins response in cattle that is associated with pathology. *Int. J. Parasitol.*, 33 : 1409-1418.

- [50] Glass E.J., Preston P.M., Springbett A., Craigmile S., Kirvar E., Wilkie G., Brown C.G.D. 2005. *Bos taurus* and *Bos indicus* (sahiwal) calves respond differently to infection with *Theileria annulata* and produce markedly different levels of acute phase proteins. *Int. J. Parasitol.*, 337-347.
- [51] Gosrani E. 1999. Contribution à l'étude épidémiologique d'un foyer de la theilériose bovine à *Theileria annulata* dans l'oasis de Gabès. Thèse en médecine vétérinaire. Ecole Nationale de Médecine Vétérinaire de Sidi Thabet, Tunisie. 72 pp.
- [52] Graham S.P., Brown D.J., Vatansever Z., Waddington D., Taylor L.H., Nichani A.K., Campbell J.D., Adamson R.E., Glass E.J., Spooner R.L. 2001. Proinflammatory cytokine expression by *Theileria annulata* infected cell lines correlates with the pathology they cause *in vivo*. *Vaccine*, 19 : 2932-2944.
- [53] Gryseels B., Berkvens D. 1999. Theileriosis : a model for vaccines against animal and human parasites . *Trop. Med. Int. Health*, 9 : 595.
- [54] Gubbels M.-J., Katzer F., Shiels B.R., Jongejan F. 2001. Study of *Theileria annulata* population structure during bovine infection and following transmission to ticks. *Parasitol.*, 123 : 553-561.
- [55] Hall R., Adamson R., Boulter N. 2002. Prime-boost: the way forward for recombinant vaccines against apicomplexan parasites. A *Theileria* perspective. *Parasitol Res.*, 88 (13 Suppl 1) : S45-7.
- [56] Hall R., Ilhan T., Kirvar E., Wilkie G., Preston P.M., Darghouth M.A., Somerville R., Adamson R. 1999. Mechanism(s) of attenuation of *Theileria annulata* vaccine cell lines. *Trop. Med. Int. Health*, 9 : A78-A84.
- [57] Hashemi-Fesharki R. 1988. Control of *Theileria annulata* in Iran. *Parasitol. Today*, 4 : 36-40.
- [58] Hoogstraal H. 1956. African Ixodidae. Vol. 1: Ticks of the Soudan (with special reference to Equatoria province and with preliminary reviews of the genre *Boophilus*, *Megaporous* and *Hyalomma*). Research report N° NM 005 050.29.07 of the Narval Medical Research Unit 3. Cairo.
- [59] Huygen K. 2005. Plasmid DNA vaccination. *Microbes Infect.* 5-6: 932-938.
- [60] Ilhan T., Williamson S., Kirvar E., Shiels B., Brown C.G. 1998. *Theileria annulata*: carrier state and immunity. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 849 : 109-25.

- [61] Innes E., Millar P., Glass E.J., Brown C.G.D., Spooner R.L. 1989. *In vitro* infection of alloreactive bovine T cell lines with sporozoites of *Theileria annulata* and *Theileria parva*. Res. in Vet. Sc., 46 : 367-374.
- [62] Irvin A.D., Morrisson W.I. 1987. Immunopathology, immunology and immunoprophylaxis of *Theileria* infection. In: Soulsby E.J.L. (Edit.). Immune responses in parasitic infection: Immunopathology, immunology and immunoprophylaxis. Boca Raton, Florida. Ed. CRC Press., Vol. 3, 223-273.
- [63] Karagenç T. 2002. Development of ELISA test in tropical theileriosis. Atelier sur l'optimisation et la standardisation du diagnostic et du dépistage des maladies transmises par les tiques dans la Région du Maghreb. 11 - 14 Décembre 2002, Gammarth, Tunisie.
- [64] Karoui A. 2005. Enquête sur la theilériose tropicale dans la région de la basse vallée de la Majerda : perception de la lutte et application de la lutte acaricide par l'éleveur. Thèse en médecine vétérinaire. Ecole Nationale de Médecine Vétérinaire de Sidi Thabet, Tunisie. 54 pp.
- [65] Karoui M. 2002. Suivi de l'infection sur les veaux en première saison de theilériose tropicale dans l'état d'endémie stable : application à l'évaluation de l'intérêt de la vaccination contre la theilériose tropicale. Thèse en Médecine Vétérinaire, Ecole Nationale de Médecine Vétérinaire de Sidi Thabet, Tunisie. 68 pp.
- [66] Kilani M., Bouattour A. 1984. Essai préliminaire de traitement de la theilériose bovine en Tunisie par la parvaquone. Revue Méd. Vét., 135 : 289-296.
- [67] Knight P., Musoke A.J., Gachania J.N., Nene V., Katzer F., Boulter N., Hall R., Brown C.G.D., Williamson S., Kirvar E., Bell-Sakyi L., Hussain K., Tait A. 1996. Conservation of neutralizing determinants between the sporozoite surface antigens of *Theileria annulata* and *Theileria parva*. Exp. Parasitol., 82 : 229-241.
- [68] Lebbi R. 1991. Contribution à l'étude épidémiologique de la theilériose bovine dans la région de Sidi Thabet. Etude comparée du parasitisme des veaux adultes par les tiques *Hyalomma*. Thèse en Médecine Vétérinaire, Ecole Nationale de Médecine Vétérinaire de Sidi Thabet, Tunisie. 62 pp.
- [69] M'barek M. 1994. Incidence de la theilériose sur la production laitière bovine : essai d'estimation préliminaire dans la région Nord-Est de la basse vallée de

- la Medjerda. Thèse en Médecine Vétérinaire, Ecole Nationale de Médecine Vétérinaire de Sidi Thabet, Tunisie. 62 pp.
- [70] Mahoney D.F. 1977. *Babesia* of domestic animals. In: J.P. Kreier (editor), Parasitic protozoa. Vol. IV. Academic Press, New York, pp. 1-52.
- [71] Mansour S. 2005. Enquête sur la theilériose tropicale dans la région de Sousse: Perception de la maladie et application de la lutte acaricide par l'éleveur. Thèse en Médecine Vétérinaire, Ecole Nationale de Médecine Vétérinaire de Sidi Thabet, Tunisie. 53 pp.
- [72] Méndez S., Belkaid Y., Seder R.A., Sacks D. 2002. Optimization of DNA vaccination against cutaneous leishmaniasis. *Vaccine*, 20 : 3702–3708.
- [73] Mhadhbi M. 2004. Caractérisation génétique des isolats tunisiens de *Theileria annulata* potentiellement résistants à la buparvaquone par électrophorèse isoenzymatique. Diplôme de Mastère en génétique et biologie moléculaire. Faculté des sciences de Tunis, Tunisie, 51 pp.
- [74] Miladi N. 2005. Diagnostic microscopique de la theilériose tropicale : effet de la conservation des prélèvements sanguins au réfrigérateur et à température ambiante. Thèse en médecine vétérinaire. Ecole Nationale de Médecine Vétérinaire de Sidi Thabet, Tunisie. 34 pp.
- [75] Ministère de l'agriculture et des ressources hydrauliques, Tunisie. 1995. Enquête sur les structures des exploitations agricoles : 1994-1995. page 136.
- [76] Minjaw B., McLeod A., 2003. Tick-borne diseases and poverty: The impact of ticks and tick-borne disease on the livelihoods of small-scale and marginal livestock owners in India and Eastern and Southern Africa. Research report, DFID animal health programme. Centre of tropical veterinary medicine. University of Edinburgh, United Kingdom, 116 pp.
- [77] Morel P.C. 1969. Contribution à la connaissance de la distribution des tiques (Acariens, Ixodidae et Amblyommidae) en Ethiopie continentale. Thèse de doctorat ès sciences naturelles. Faculté des Sciences d'Orsay. CD ROM édité par le CIRAD EMVT, France.
- [78] Morel P.C. 1981. Maladies à tiques du bétail en Afrique. In Troncy P.M., Itard J., Morel P.C. : Précis de parasitologie médicale et comparée. Ed. Ministère de la Coopération et du Développement, France. pp. 594 – 595.
- [79] Morel P.C. 1995. Les tiques d'Afrique et du Bassin Méditerranéen. CD ROM édité par le CIRAD EMVT, France.

- [80] Morzaria S.P., Irvin A.D., Wathanga J., D'Souza D., Katende J., Young A.S., Scott J., Gettinby G. 1988. The effect of East Coast Fever immunisation and different acaricidal treatments on the productivity of beef cattle. *Vet. Record*, 17 : 313 - 320.
- [81] Mukhebi A.W. 1992. Economic impact of theileriosis and its control in Africa, in *The epidemiology of theileriosis in Africa*. Norval E.A.I., Perry B.D., Young A.S. (Editors). Academic Press, 380-403.
- [82] Mukhebi A.W., Wathanga J., Perry B.D., Irvin A.D., Morzaria S.P. 1989. Financial analysis of East Coast fever control strategies on beef production under farm conditions. *Vet. Record*, 28 : 456 - 459.
- [83] Naouach A. 2001. Evaluation de l'effet de la buparvaquone sur deux souches ST1/13 et ST2/19 de *Theileria annulata* potentiellement résistantes. Thèse en Médecine Vétérinaire, Ecole Nationale de Médecine Vétérinaire de Sidi Thabet, Tunisie. 69 pp.
- [84] Nichani A.K., Campbell J.D.M., Glass E.J., Graham S.P., Craigmile S.C., Brown C.G.D., Spooner R.L. 2003. Characterization of efferent lymph cells and their function following immunization of cattle with an allogenic *Theileria annulata* infected cell line. *Vet Immunol. Immunopathol.* 93: 39-49.
- [85] Nichani A.K., Mena A., Popowych Y., Dent D., Townsend H.G.G., Mutwiri G.K., Hecker R., Babiuk L.A., Griebel P.J. 2004. *In vivo* immunostimulatory effects of CpG oligodeoxynucleotide in cattle and sheep. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 98 : 17-29.
- [86] Nicholas B.L., Brennan F.R., Hamilton W.D.O., Wakelin D. 2003. Effect of priming/booster immunisation protocols on immune response to canine parvovirus peptide induced by vaccination with a chimaeric plant virus construct. *Vaccine*, 21 : 2441–2447.
- [87] OIE. 2005. Theileriosis, in: *Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals*, CHAPTER 2.3.11. [on line] (2004) [http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A\\_00062.htm](http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_00062.htm) [consulted 22 February 2005].
- [88] Oura C.A.L., Bishop R.P., Wampande E.M., Lubega G.W., Tait A. 2004. Application of a reverse line blot assay to the study of haemoparasites in cattle in Uganda. *Int. J. Parasitol.*, 603-613.

- [89] Pain A., Renauld H., Berriman M., Murphy L., Yeats C.A., Weir W., Kerhornou A., Aslett M., Bishop R., Bouchier C., Cochet M., Coulson R.M., Cronin A., de Villiers E.P., Fraser A., Fosker N., Gardner M., Goble A., Griffiths-Jones S., Harris D.E., Katzer F., Larke N., Lord A., Maser P., McKellar S., Mooney P., Morton F., Nene V., O'Neil S., Price C., Quail M.A., Rabbinowitsch E., Rawlings N.D., Rutter S., Saunders D., Seeger K., Shah T., Squares R., Squares S., Tivey A., Walker A.R., Woodward J., Dobbelaere D.A., Langsley G., Rajandream M.A., McKeever D., Shiels B., Tait A., Barrell B., Hall N. 2005. Genome of the host-cell transforming parasite *Theileria annulata* compared with *Theileria parva*. *Science*, 309 : 131-133.
- [90] Pertmer T.M., Roberts T.R., Haynes J.R. 1996. Influenza virus nucleoprotein-specific immunoglobulin G subclass and cytokine responses elicited by DNA vaccination are dependent on the route of vector DNA delivery. *J. Virol.*, 70 : 6119-6125.
- [91] Pipano E. 1995. Live vaccines against hemoparasitic diseases in livestock. *Vet. Parasitol.*, 57 : 213-231.
- [92] Pipano E., Tsur I. 1966. Experimental immunisation against *Theileria annulata* using a tissue culture vaccine. *Refuah Veterinarith.*, 23 : 186-194.
- [93] Preston P.M., Darghouth M., Boulter N.R., Hall F.R., Tall R., Kirvar E., Brown C.G. 2002. A dual role for immunosuppressor mechanisms in infection with *Theileria annulata*: well-regulated suppressor macrophages help in recovery from infection; profound immunosuppression promotes non-healing disease. *Parasitol Res.*, 88 : 522-34.
- [94] Preston P.M., Hall F.R., Glass E.J., Campel J.D.M., Darghouth M.A., Ahmed J.D., Shiels B.R., Spooner R.L., Jongejan F., Brown C.G.D. 1999. Innate and adoptive immune response cooperate to protect cattle against *Theileria annulata*. *Parasitol. Today*, 15, 7 : 268 – 274.
- [95] Radley D.E. 1981. Infection and treatment method of immunisation against theileriosis. In Irvin A.D., Cunningham M.P., Young A.S. *Advances in the control theileriosis*. Ed. Martinus Nijhof Publishers. pp. 227-237.
- [96] Ramiro M.J., Zárate J.J., Hanke T., Rodriguez D., Rodriguez J.R., Esteban M., Lucientes J., Castillo J.A., Larraga V. 2003. Protection in dogs against visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* is achieved by

- immunisation with a heterologous prime-boost regime using DNA and vaccinia recombinant vectors expressing LACK. *Vaccine*, 21 : 2474–2484.
- [97] Ramshaw I.A., Ramsay A.J. 2000. The prime-boost strategy: exciting prospects for improved vaccination. *Immunol. Today*, 21 : 163-5.
- [98] Richardson J.O., Forsyth L.M.G., Brown C.G.D., Preston P.M. 1998. Nitric oxide causes the macroschizonts of *Theileria annulata* to disappear and host cells to become apoptotic. *Vet. Res. Communication*, 22 : 31-45.
- [99] Samish M., Pipano E. 1981. Preparation and application of *Theileria annulata* infected stabilate. In Irvin A.D., Cunningham M.P., Young A.S. *Advances in the control theileriosis*. Ed. Martinus Nijhof Publishers. pp. 253-255.
- [100] Sergent E., Donatien A., Parrot L., Lestoquard F. 1945. *Etude des piroplasmoses bovines*. Ed. Institut Pasteur d'Algérie. 816 pp.
- [101] Shiels B.R. 1999. Should I stay or should I go ? A stochastic model of stage differentiation in *Theileria annulata*. *Parasitol. Today*, 15 : 241-245.
- [102] Shiels B.R. 1999. Should I stay or should I go. A stochastic model of stage differentiation in *Theileria annulata*. *Parasitol. Today*, 15 : 241-245.
- [103] Singh D.K., Varshney B.C., Raghav P.R.S., Thakur M. 1993. Response of crossbred calves to immunization with *Theileria annulata* schizont infected lymphoid cells cultures. *Indian Vet. J.*, 70 : 605-608.
- [104] Singh J., Gill J.S., Kwaeta M.S., Sharma K.K. 1993. Treatment of theileriosis in crossbred cattle in the Punjab. *Trop. Anim. Health Prod.*, 25 : 75-78.
- [105] Singh, D.K, 1991. Theileriosis in India, In: Singh, D.K. and Varshney, B.C. (Eds), *Proc. second EEC workshop on orientation and co-ordination of research on tropical theileriosis*, national dairy development board, Anand, India, pp. 23-28. 621.
- [106] Somerville R.P., Littlebury P., Pipano E., Brown C.G., Shkap V., Adamson R.E., Oliver R.A., Glass E.J., Hall F.R. 1998. Phenotypic and genotypic alterations associated with the attenuation of a *Theileria annulata* vaccine cell line from Turkey. *Vaccine*, 16(6) : 569-575.
- [107] Soudani M.C. 1995. Contribution à l'étude épidémiologique de la theilériose bovine à *Theileria annulata* : analyse clinique, parasitologique et sérologique de l'infection naturelle des veaux en première saison estivale.



- Thèse en Médecine Vétérinaire, Ecole Nationale de Médecine Vétérinaire de Sidi Thabet, Tunisie. 68 pp.
- [108] Sparagano O., Jongejan F. 1999. Molecular characterization of ticks and tick-borne pathogens. *Parassitologia*, 41 (Suppl 1) :101-105.
- [109] Spooner R.L., Innes E.A., Glass E.J., Brown C.G.D. 1989. *Theileria annulata* and *Theileria parva* infect and transform different bovine mononuclear cells. *Immunol.*, 66 : 284-288.
- [110] Stepanova N.I., Zablotskii V.T. 1989. Bovine theileriosis in the URSS. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epizoot.*, 8 : 89-92.
- [111] Sutherland I.A., Shiels B.R., Jackson L.A., Brown D.J., Brown C.G.D., Preston P.M. 1996. *Theileria annulata*: altered genes expression and clonal selection during continuous *in vitro* culture. *Exp. Parasitol.*, 83 : 125-133.
- [112] Tait A., Hall R. 1990. *Theileria annulata*: control measures, diagnosis and the potential use of subunit vaccines. *Rev. Sci. Tech.*, 9 (2) : 387-403.
- [113] Tait A., Oura C. 2004. Reverse line blotting: a new technique for the sensitive detection of tick borne pathogens. *Arch. Instit. Pasteur de Tunis*, 1,2,3 et 4 : 47-50.
- [114] Tsur-Tchernomorentz I. 1945. Multiplication *in vitro* of Koch bodies of *Theileria annulata*. *Nature*, 156, 391.
- [115] Uilenberg G. 2004. Diagnostic microscopique des maladies transmises par les tiques au Maghreb. *Arch. Instit. Pasteur de Tunis*. 1,2,3, et 4 : 35-40.
- [116] Walker A.R., Bouattour A., Camicas J.-L., Estrada-Pena A., Horak I.G., Latif R.G., Pegram R.G., Preston P.M. 2003. Ticks of domestic animals in Africa. Ed. Bioscience Reports, Edinburgh. 221 pp.
- [117] Williamson S., Tait A., Brown D., Walker A., Beck P., Shiels B., Fletcher J., Hall R. 1989. *Theileria annulata* sporozoite antigen expressed in *Escherichia coli* elicits neutralising antibody. *Proc. of the Nat. Acad. of Sc., USA*. 86: 4639-4643.
- [118] Woodland D.L. 2004. Jump-starting the immune system : prime-boost comes of age. *Trends Immunol.*, 2 : 98-104.
- [119] Xing Y.P., Huang Z.H., Wang S.X., Cai J., Li J., Chou T.H., Lu S., 2005. Novel DNA vaccine based on hepatitis B virus core gene induces specific immune responses in Balb/C mice. *World J. Gastroenterol.*, 11 : 4583-6.

- [120] Zablotsky V.T. 1991. Specific prevention of bovine theileriosis in Soviet Union. In: Singh D.K., Varshney B.C. (Eds), Proc. second EEC workshop on orientation and co-ordination of research on tropical theileriosis, national dairy development board, Anand, India, pp. 9-10.

# Partie expérimentale

## **Première partie expérimentale :**

Infection des veaux par *Theileria annulata* en Tunisie :  
analyse économique et évaluation du bénéfice potentiel de la  
vaccination

## Article

**Infection of calves with *Theileria annulata* in Tunisia: economic analysis and evaluation of the potential benefit of vaccination**

**M. GHARBI, L. SASSI, P. DORCHIES, M. A. DARGHOUTH**

Accepté dans Veterinary Parasitology

## Introduction

Depuis la fin de la première guerre mondiale, les agriculteurs se sont rendus compte de l'importance d'une gestion financière rationnelle de leurs activités. L'agriculture a été reconnue comme étant une activité économique à part entière et les agriculteurs comme des acteurs économiques. Ce n'est que vers les années soixante dix que l'économie de la santé animale s'est détaché de l'économie agricole pour devenir une discipline indépendante (Perry et Randolph, 1999).

L'importance économique des maladies parasitaires dans les pays en développement diffère fondamentalement de celle dans les pays développés. Pour ces derniers, les parasitoses ont été diagnostiquées, typées et des programmes de lutte ont été instaurés depuis plusieurs années. De ce fait, le coût des parasitoses dans ces pays est inhérent à la lutte (Perry et Randolph, 1999). Par contre, dans les pays en développement l'importance des parasitoses est inhérente à leur impact économique et des coûts de la lutte. En Tunisie et à partir de la fin des années soixante dix, un programme national d'amélioration génétique a été mis en place, il visait en premier lieu l'introduction de bovins de race pie noire dans des élevages pilotes et par la suite la généralisation de l'élevage de ces animaux.

Chaque année en Tunisie, entre 2.500 et 3.000 cas cliniques nécessitent un traitement theiléricide (Bahri et al., 1995 ; Darghouth, 2004 communication personnelle). L'infection évolue en Tunisie selon trois états endémiques : l'endémie stable, l'endémie instable modérée et l'endémie instable élevée (Darghouth et al., 1996). La majorité des cas de theilériose tropicale proviennent d'élevages en

endémie instable élevée justifiant ainsi, la concentration des efforts de lutte sur ces élevages. Ce polymorphisme de la typologie épidémiologique oriente la lutte contre la theilériose tropicale vers la mise en place de programmes raisonnés de prophylaxie. Elle nécessite le recours à deux outils : la lutte contre le vecteur et la vaccination des animaux. Se basant sur l'administration de parasites atténués par cultures de cellules infectées, la vaccination a été utilisée sur le terrain avec succès dans plusieurs pays dont la Turquie, l'Inde, l'Iran, Israël et la Tunisie (Gautam, 1981 ; Gill et al., 1981 ; Ozkoc et Pipano, 1981 ; Samish et Pipano, 1981 ; Darghouth et al., 2003).

Malgré l'importance économique de la theilériose tropicale, aucune étude n'a été réalisée pour évaluer l'impact financier de la maladie et le ratio coût-bénéfice apporté par la mise en place de programmes de vaccination des animaux. Cette étude serait d'autant plus utile que les vaccins développés contre la theilériose tropicale sont des vaccins anti-maladie et non anti-infection, ils n'empêchent pas la transmission de l'infection aussi bien vers la tique que vers le bovin, et s'éloignent de ce fait des concepts classiques connus en vaccinologie anti-virale et anti-bactérienne.

Dans le présent travail, nous avons pris comme modèle épidémiologique l'endémie stable pour l'évaluation de l'impact financier de la theilériose tropicale sur les veaux étant donné : (i) Des considérations logistiques, à savoir la disponibilité d'élevages en situation d'endémie stable dans une région limitrophe du village de Sidi Thabet et qui ont été suivis depuis 10 ans. (ii) L'exposition de la quasi-totalité des veaux appartenant à ces élevages à l'infection par *T. annulata*. (iii) L'évolution de l'infection chez ces veaux sous deux formes, la forme clinique et la forme sub-clinique.

Pris comme modèle de l'analyse financière, les trois élevages en endémie stable à la theilériose tropicale ont été suivis tout au long de la période estivale sur 2 saisons consécutives de theilériose. L'étude ainsi menée avait un objectif triple : (i) Situer les pertes financières dues à la theilériose tropicale chez des veaux

entretenus dans des étables en situation d'endémie stable. (ii) Fournir des indicateurs relatifs à l'impact financier de la theilériose tropicale qui peuvent être utilisés pour des estimations à l'échelon national (voire régional). (iii) Mettre en place un modèle simple pour la faisabilité économique de la vaccination dans ce type d'élevages en se basant sur les résultats obtenus par la vaccination en conditions de terrain en Tunisie.

Ces éléments ont motivé le présent travail qui est présenté sous la forme d'un article comportant deux parties :

Une étude épidémiologique car la fiabilité des études économiques est conditionnée par la disponibilité de données épidémiologiques de qualité (Perry et Randolph, 1999). De plus, Morris (1999) propose d'effectuer la collecte des données épidémiologiques et économiques de manière conjointe et ce afin de répondre aux deux aspects dans une même enquête.

Dans la deuxième partie du travail, nous avons estimé l'impact financier de la theilériose tropicale en intégrant aussi bien l'effet de l'infection clinique que celui de l'infection sub-clinique sur la croissance des animaux. Il a été alors possible d'estimer le ratio bénéfice - coût de la vaccination des veaux avec un vaccin vivant atténué.



Date: 10 Jan 2006  
To: "Mohamed Aziz Darghouth" damaziz@yahoo.fr  
From: vetpar@elsevier.com  
Subject: VETPAR-D-05-00182R2 Decision

Ms. No. VETPAR-D-05-00182R2  
Infection of calves with *Theileria annulata* in Tunisia: economic analysis and evaluation of the potential benefit of vaccination

Dear Pr Darghouth,

I am pleased to be able to inform you that your manuscript has been accepted for publication in *Veterinary Parasitology*.

The manuscript will be transferred to our Production Department. Proofs will be sent to you in due course.

With kind regards

Nienke de Jong  
Editorial Office Manager  
*Veterinary Parasitology*

---



## Infection of calves with *Theileria annulata* in Tunisia: Economic analysis and evaluation of the potential benefit of vaccination

Mohamed Gharbi<sup>a</sup>, Limam Sassi<sup>a</sup>, Philippe Dorchies<sup>b</sup>,  
Mohamed Aziz Darghouth<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Laboratoire de Parasitologie, École Nationale de Médecine Vétérinaire, 2020 Sidi Thabet, Tunisia

<sup>b</sup>Laboratoire de Parasitologie, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, 23, Chemin des Capelles, 31076 Toulouse Cedex, France

Received 7 May 2005; received in revised form 13 December 2005; accepted 10 January 2006

### Abstract

A field study aiming to estimate the costs of tropical theileriosis was carried out in an endemic region of the North of Tunisia. Three farms were monitored for two successive summer seasons. A total number of 56 calves and 12 sentinel cows were monitored. Calves were ranked into four groups: non infected animals, diseased animals with clinical tropical theileriosis, sub-clinical *Theileria annulata* infected animals with anaemia and sub-clinical *T. annulata* infected animals without anaemia. The total costs due to disease and infection were estimated to be 15,115.058 TD (€9388.20). A high proportion of these costs (50.81%) is accounted for by asymptomatic infection. Sub-clinical infections with anaemia showed the highest losses in live weight, while disease cases (prevalence 42.86%) are responsible for 23.64% of the losses with death as the most important element. A cost–benefit analysis of vaccination using a Tunisian attenuated cell line vaccine was also undertaken. Considering that the vaccine would cost 5 TD (€3.10), the cost–benefit ratio of vaccination is 23.7. Sensitivity analysis of the vaccination costs shows that the indifference decision point is around 118 TD (€73.29).

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Tropical theileriosis; Economics; Cattle; Tunisia; Epidemiology; Vaccination; Cost–benefit analysis

### 1. Introduction

In Tunisia, tropical theileriosis, caused by the protozoan *Theileria annulata* and transmitted by the

two host tick *Hyalomma detritum detritum*, is one of the most frequent summer diseases of cattle with an annual total of declared cases ranging between 2500 and 3000 (Bahri et al., 1995; Darghouth, personal communication). This disease is presently one of the most serious threats to the development of a pure bred dairy cattle industry particularly for smallholder farmers who, at present, own the major part of the

\* Corresponding author. Tel.: +216 71 552 200x264;  
fax: +216 71 552 441.

E-mail address: [damaziz@yahoo.fr](mailto:damaziz@yahoo.fr) (M.A. Darghouth).

national cattle herd (Tunisian Ministry of Agriculture, 1995).

Based on serological profiles of the herds, incidence and age distribution of disease cases, Darghouth et al. (1996b) have identified three endemic states in Tunisia, namely: endemic stability, low endemic instability and high endemic instability. The endemic stability is usually reported in traditionally managed farms and is mainly associated with a low disease incidence and the occurrence of clinical cases restricted to calves in their first disease season (Darghouth et al., 1996b). This low disease incidence, together with the low frequency of endemic stability in the main endemic region for tropical theileriosis in Tunisia, leads to consider this endemic state as a low priority target by comparison to endemic instability in the control of tropical theileriosis in Tunisia. The limited frequency of endemic stability in Tunisia coupled with low disease incidence usually recorded in this endemic state highlights the regions of endemic instability as a priority for the control of tropical theileriosis (Darghouth et al., 2003). Recently, clinical cases have shown a significantly higher incidence in farms in endemic stability of tropical theileriosis, justifying then to reconsider the importance of this disease in such farms (Soudani, 1995; Karoui, 2002).

In the study presented here, we have undertaken a longitudinal survey aimed at estimating the economic losses caused by clinical and sub-clinical *T. annulata* infection in calves at their first theileriosis season. The data obtained have allowed the potential cost–benefit ratio of vaccination (using a live schizont attenuated Tunisian vaccine against *T. annulata* (Darghouth et al., 1999)) to be evaluated. The results obtained can serve as a basis for defining the options for control of tropical theileriosis in the endemic regions in Tunisia.

## 2. Material and methods

### 2.1. Animals

This study was carried out in the El Hessiène village (District of Ariana), within the semi-arid region of Tunisia in three farms previously shown to be endemically stable for tropical theileriosis (Darghouth et al., 1996b). The cattle are housed in cattle-sheds with crevices and cracks in the walls. All the

animals were Friesian–Holstein cross-bred and are managed under the extensive traditional system. Animals graze on natural pasture early in the morning, but are returned to the farm at the end of the morning, while calves and bulls are always maintained in the farm.

The survey was carried out over two consecutive tropical theileriosis seasons (summers 2002 and 2003). The farms were visited in May, before the start of the tropical theileriosis season, and all the calves aged 3–9 months old were sampled. The lower age limit was used in order to avoid the interference of colostral antibodies with the serological detection of infection. The upper limit was chosen in order to only sample naive calves born after the previous tropical theileriosis season (after August). A total number of 56 calves (29 in 2002 and 27 in 2003) were monitored. Twelve adult cows (two from each farm and per summer season) were also monitored for tick infestation.

Only healthy calves with no *T. annulata* infection were included in the survey. Their infection state was assessed by serology and blood smear examination. The animals were ear tagged and then surveyed over the two tropical theileriosis seasons. In each farm, two sentinel cows were chosen at random in order to monitor the dynamics of tick activity. Farms were visited twice a month between May and the end of August. At each visit, the farmers were questioned about the nutrition of the calves and all health troubles that had occurred between the two visits. In the three surveyed farms, calves were given the same diet, with the distribution of hay ad libitum complemented with barley.

### 2.2. Estimation of calves live weight

The live weight of calves was estimated using the barymetric method (Dodo et al., 2001). The thoracic circumference was measured and live weight estimated using the conventional formula:  $W = 100(C)^3$ , where  $W$ : estimated weight (kg) and  $C$ : thoracic circumference (m).

### 2.3. Clinical and parasitological survey

At each visit, the animals were checked for clinical signs particularly those suggesting tropical theileriosis

infection, as reported by Darghouth et al. (2003). Individual blood samples were collected from the jugular vein in EDTA and dry vacutainer tubes for the preparation of blood smears and sera, respectively.

### 2.3.1. Detection of infection with *T. annulata*

In the laboratory, blood smears prepared from each calf at each visit were Giemsa stained. The slides were examined for piroplasms of *T. annulata*, by standard microscopy and the presence of piroplasms recorded by examining 50 microscope fields. This test was also used to confirm clinical cases presented by the farmers during or between the visits.

The immunofluorescent antibody test (IFAT) serological test was used in this survey. This test is to date the most widely used serological test for anti-*T. annulata* antibody detection (OIE, 2005). An evaluation of the basic features of the schizont IFAT for calves at primary infection showed a sensitivity of 88.9% and a specificity of 97% (Darghouth et al., 2004). The antigen slides were prepared from the strain Jedaida 4. The IFAT protocol followed was that detailed by Darghouth et al. (1996c). Sera were tested at the dilutions of 1/40 and 1/160, with the latter dilution used as the cut-off (Darghouth et al., 1996c).

### 2.3.2. Measurement of haemoglobinaemia

The haemoglobinaemia was estimated with a coulter counter T540. The presence of anaemia was defined on the basis of haemoglobin levels below 8 g/100 ml (Blood and Radostitis, 1989).

### 2.3.3. Status of the animals

The status of infection with *T. annulata* was defined for each calf by combining the results of parasitological, haematological, clinical and serological monitoring as follows:

- (i) *Non infected animals*: Calves with both negative blood smears and IFAT during the survey.
- (ii) *Clinical infections*: This group includes the animals reported ill by the farmer with symptoms of tropical theileriosis and confirmed by examination of a Giemsa stained blood smear.
- (iii) *Sub-clinical infections*: This group was defined as calves not reported ill by the farmer but presenting either a positive blood smear or

positive serology (or both) at least once during the survey.

Calves with sub-clinical infections have been divided into two sub-groups, according to the presence or the absence of anaemia. This sub-division was introduced based on the assumption that anaemia will affect the growth rate of the calves as described for other tick-borne pathogens in Kenya (Moll et al., 1987).

### 2.3.4. Treatment of the calves with clinical forms of tropical theileriosis

In order not to interfere with the usual management of the herds, only confirmed clinical cases of tropical theileriosis were treated. The most common treatment followed by field veterinarians was used in the present study. The treatment consisted of an intramuscularly injection of buparvaquone at the conventional dose of 2.5 mg/kg (Butalex<sup>®</sup>, Schering-Plough). This injection was repeated if no sufficient improvement of the clinical state was observed within 48 h of the first injection. An additional treatment consisting of an intramuscular injection of long acting oxytetracycline at the conventional dose of 20 mg/kg was also given. All the treatments were provided free of charge to the farmers to encourage them to present all the suspected clinical cases occurring in the surveyed animals.

### 2.3.5. Tick infestation

For both the calves and the sentinel cows, the total number of ticks was estimated and up to 10 ticks attached in lower body regions of each sentinel cow were collected and conserved in 70% alcohol. Ticks feeding on calves were only counted and not removed in order not to interfere with the transmission dynamic of *T. annulata*. The identification of the ticks species was based on the key of Walker et al. (2003). No recommendations were made to the farmer concerning tick control so that no bias was introduced into the survey. The normalisation of tick numbers was made by calculating:  $\log(\text{number of ticks}) = \log(\text{number of ticks} + 1)$ .

## 2.4. Epidemiological indicators

The epidemiological indicators used in this work are defined and detailed in Table 1. Animals that

Table 1  
Epidemiological indicators of tropical theileriosis in the three farms

Epidemiological indicator	Definition	Ratio	Percentage
Prevalence of positive blood smears (Pbs)	Pbs: number of positive blood smears/total number of sampled calves at the corresponding visit	48/56	85.71
Serological prevalence (Ps)	Ps: number of positive sera/total number of tested sera	42/56	75
Total prevalence of infection (Pi)	Pi: number of calves positive to blood smear and/or IFAT/total number of calves present during the survey	52/56	92.86
Cumulated incidence of clinical cases (Ic)	Ic: number of new clinical cases/number of calves	24/56	42.86
Lethality rate in calves (L)	L: number of dead due to tropical theileriosis/total number of diseased calves	7/24	29.17
Mortality rate (M)	M: number of calves dead with tropical theileriosis/total number of calves present during the survey	7/56	12.5

presented with two clinical episodes of tropical theileriosis were counted once for the estimation of epidemiological indicators.

## 2.5. Financial analysis

### 2.5.1. Economic impact of tropical theileriosis

The financial impact of tropical theileriosis in calves was estimated by considering three components: direct costs due to veterinary intervention, the cost of mortality and non medical costs due to slower weight gains and, in some cases, weight losses (Tisdell et al., 1999). Indirect costs due to the impact of the disease on market access and on demand and supply were not estimated in this study (Minjaw and McLeod, 2003).

**2.5.1.1. Veterinary expenses.** Public prices of the medicines used to treat the tropical theileriosis cases were determined by referring to the list of prices of “Pharmacie Centrale de Tunisie” which is the

exclusive distributor of imported drugs in Tunisia. Veterinarian fees and transport were estimated according to the nomenclature proposed by “Conseil National de l’Ordre des Médecins Vétérinaires de Tunisie”. These costs are detailed in Table 2.

**2.5.1.2. Mortality.** The cost of each lethal case was evaluated by considering the live weight of the calf at the last visit before the occurrence of the disease with the market price per kilogram of live weight during the study period (Table 2).

**2.5.1.3. Live weight variation.** Calves live weight estimation was done by the barymetric method, which is a simple and reliable estimation method (Dodo et al., 2001). In cattle, growth rates are highly influenced by the age of the animals (Guilhermet, 1988). In order to homogenise the results, without having to consider the age of the monitored calves, the evolution of the live weight increases was expressed by calculating the relative mean variation of live

Table 2  
Veterinary costs considered in the study

Item	Quantity	Unitary price in TD (€)
Buparvaquone (Butalex <sup>®</sup> , Schering-Plough)	2.5 mg/kg (1 ml/20 kg of body weight)	2.533 TD/ml (€1.57 ml <sup>-1</sup> )
Long acting oxytetracycline	20 mg/kg (1 ml/10 kg of body weight)	0.046 TD/ml (€0.03 ml <sup>-1</sup> )
Calf price	Variable	5 TD/kg of live body weight (€3.10 kg <sup>-1</sup> )
Veterinary consultation fees	1	15 TD (€9.32)
Transport charges	Mean distance between the farm and the veterinary: 10 km	0.3 TD/km (€0.19 km <sup>-1</sup> )

weight between the first and the last visit according to the following formula:

$$\text{Relative body weight variation (\%)} = \left( \frac{\text{live weight at visit1} - \text{live weight at last visit}}{\text{live weight at visit1}} \right) \times 100.$$

The impact of the different forms of infection on the growth rate was estimated by taking the non infected animals as a reference group for the relative live weight variation in the absence of *T. annulata* infection.

## 2.6. Financial analysis of control options

The financial output of vaccination against tropical theileriosis was analysed using partial budgeting (Dijkhuizen and Morris, 1997; Toma et al., 2001). The current situation characterised by the absence of control measures excepting treatment of clinical cases of tropical theileriosis was taken as a reference for estimating the benefits associated to vaccination.

The effects of vaccination were those determined in a field study of more than 2000 cattle using a thawed vaccine delivered to the field without cold chain through a specific delivery system that guarantees more than 4 days shelf life at room temperature (Darghouth, 2004). The adverse vaccine reactions are minimal and were restricted to lactating cows. The benefit of vaccination was estimated by considering the cost of treatment and the effect on live weight gain and mortality. We have considered that the vaccination will have the following effects on clinical forms of tropical theileriosis:

- Reduction of mortality by 100%.
- Reduction of the incidence of clinical cases by 76% as already reported in a field trial by Darghouth (2004).
- Reduction of the impact on live weight increase by switching 76% of the clinical infection group to the sub-clinical group with anaemia, and the entire sub-clinical group with anaemia to the asymptomatic group without anaemia, while we have considered that the last group will remain status quo.

In sub-clinical infection group, the effect of vaccination on live weight gain was simulated by assuming that all calves with anaemia would be converted to the group without anaemia.

In the absence of a full economic analysis of the expected cost of vaccination, we used a pessimistic scenario with a relatively high cost of 5 TD (€3.28)/animal. This includes the price of a single dose of the vaccine and the veterinary fees.

The costs and benefits of vaccination were estimated in Tunisian Dinars and in euros (1 TD = €0.62 at 2005 values) by using the losses estimated in the current study as a reference. In order to be able to compare our results to other situations, costs and benefits were also estimated in relation to the daily minimum agricultural guaranteed wage which is 7.109 TD (€4.41) in 2005.

## 2.7. Sensitivity analysis

A sensitivity analysis was undertaken by modifying the cost of a single vaccination until it reached the indifference decisional point (Grenier, 1996). The cost–benefit ratio of vaccination recorded in the present context was compared to the epidemiological situation reported in the same farms in 1991 (Darghouth et al., 1996b) when all the animals were cross-bred. The veterinary costs of tropical theileriosis were calculated by considering the clinical incidence of 7.7% reported by the previous authors and the mortality rate recorded in the present survey. The cost of infection on growth rate was evaluated on the basis of the prevalence of sub-clinical infection recorded in the present survey. In the absence of previous economic studies we have assumed that the impact of sub-clinical infection on growth of cross-bred calves will range between the effects obtained presently on sub-clinical calves with anaemia and sub-clinical calves without anaemia, respectively.

## 2.8. Statistical analysis

Variation of live weight in the four groups of calves defined by their infection status was evaluated by an analysis of variance. Means were compared using the Duncan test. Statistical analysis was made using the SAS 6 software (SAS, 1991).

### 3. Results

#### 3.1. Infection with *T. annulata*

The combination of both serology and blood smear results revealed an overall infection prevalence of 92.86%. The epidemiological indicators were calculated, on the basis of clinical, parasitological and serological criteria, and are presented in Table 1.

In the three farms and for both theileriosis seasons, no clinical cases have been observed in the 12 monitored cows or in the rest of animals having more than one tropical theileriosis season, but 24 clinical cases of tropical theileriosis (16 cases in 2002 and 8 in 2003) with typical clinical signs of tropical theileriosis associated to parasitaemias of at least 10% were recorded giving an overall cumulated incidence of clinical cases of 42.86%. All these cases required specific treatment. Variation of the clinical incidence of tropical theileriosis during the survey as well as the number of ticks on calves and sentinel cows are presented in Fig. 1. A total number of 225 ticks were collected from adult cows, 99.11% of them belongs to the *H. detritum detritum* species; two specimens were identified as *H. marginatum marginatum*. The dynamics of tick infestation in calves and cows is unimodal with a maximum in July. Interestingly, the peak incidence of tropical theileriosis was delayed by almost 2 weeks in comparison to the peak of tick infestation (Fig. 1). The average number of ticks/season on the animals was 14 and 323 for calves and the sentinel cows, respectively.

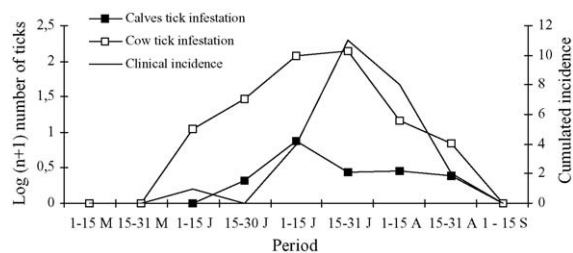


Fig. 1. Variation of clinical incidence of tropical theileriosis in calves and the number of ticks on calves and sentinel cows during the survey period. M: May, J: June, J: July, A: August and S: September.

#### 3.2. Costs of tropical theileriosis

Clinical cases were presented by the farmer either at the Veterinary School of Sidi Thabet or during the farm visits. The veterinary expenses incurred for the diagnosis and treatment of the 24 clinical cases recorded during the survey in the three farms were estimated at 1293.733 TD (€803.56), which corresponds to a mean of 53.905 TD (€33.48) per clinical case.

Amongst the treated animals, a total number of seven calves died during the two seasons. Total losses due to mortality were 3482.450 TD (€2160) (696.49 kg of live weight), with a mean cost of 497.492 TD (€309) for each death case.

The mean relative live weight gain and the weight losses calculated by reference to the non infected calves are given in Table 3 for each of the infection groups defined higher. The relative live weight increase is the highest for the non infected animals followed by the calves with sub-clinical tropical

Table 3

Relative live weight variation between the first and the last visit in the four group of calves

Group	Number	Mean weight increase (%)	Range of variation (%)	Standard error	Variation compared to the non infected group (%)	Estimated loss per case in TD (€)
Non infected (reference group)	4	29.41	[10.15; 71.34]	22.94		0 <sup>ab</sup>
Sub-clinical calves	28	14.65		10.42	-14.76	269.623 <sup>aa</sup> (167.47)
- Without anaemia	13	18.12	[7.94; 53.18]	11.26	-11.29	239.164 (148.55)
- With anaemia	15	11.65	[-9.91; 31.3]	8.95	-17.76	304.710 (189.26)
Diseased and recovered calves	17	14.68	[5.34; 25.92]	6.12	-14.73	238.210 <sup>bb</sup> (147.96)

Dead animals were not included in the estimation of the disease impact on weight losses. Data with different superscripts (a and b) are statistically significant (Duncan test,  $P < 0.05$ ).



Table 4  
Losses in TD and in € (between brackets) with regard to the clinical type of tropical theileriosis

Item	Diseased and recovered	Sub-clinical cases		Death cases
		Without anaemia	With anaemia	
Number	17	13	15	7
Weight decrease	3573.150 (2219.30)	3109.143 (1931.10)	4570.652 (2838.90)	
Treatment <sup>a</sup>	1293.733 (803.56)			
Total	4866.883 (3022.90)	3109.143 (1931.10)	4570.652 (2838.90)	3482.450 (2160)
Loss per case	286.287 (177.82)	239.165 (148.55)	304.710 (189.26)	497.492 (309)
Loss per present calf	86.908 (53.98)	55.520 (34.48)	81.619 (50.69)	62.186 (38.62)

<sup>a</sup> Mean cost per unit case = 35.937 TD (€22.32).

theileriosis without anaemia. Diseased and recovered calves with sub-clinical tropical theileriosis associated to anaemia are showing lower relative weight gain. The individual financial losses estimated by reference to the relative weight gain observed in the non infected group are ranging between 238.210 and 304.710 TD (€147.96 and 189.26, respectively) according to the infection states of the calves. Overall statistical analysis (analysis of variance) confirmed the presence of effect of infection status with *T. annulata* on live weight increase of the calves. Comparison of means revealed significant differences between non infected (29.41%) and sub-clinical groups without anaemia (18.12%) on one hand and between non infected and clinically infected group (14.68%) on the other.

The total costs of tropical theileriosis were estimated in the three farms to be 15,897.010 TD (€9873.90) during the two survey seasons, i.e. a mean cost of 285.429 TD (€152.44) per calf, corresponding to 40 days wages based on the minimum agricultural guaranteed wage (Table 4).

Weight losses are the most important components (70%), while mortality represents 22% of the losses and treatment costs only 8%. The most financially important disease group is that with sub-clinical infection as this group accounts for 48.31% of the total losses. Within this group, the highest mean losses per calf are registered in the sub-group with anaemia (304.710 TD, €189.26). When considering unit costs, calf mortality is the highest loss to the farmer.

### 3.3. Financial analysis

A comparison was made between the current situation where farmers only treat diseased calves with the potential vaccination scenario where all calves will be vaccinated with a live attenuated vaccine (Table 5). The benefit–cost ratio of vaccination was estimated as 23.7 with a mean net benefit per vaccinated calf of 111.660 TD (€69.35). When considering the clinical incidence of tropical theileriosis (7.7%) reported in 1991 by Darghouth et al. (1996b) the estimated

Table 5  
Partial budgeting of the two control options against tropical theileriosis in the three farms for one tropical theileriosis season

Costs	Value in TD (€)	Benefits	Value in TD (€)
Extra costs		Additional returns	
Vaccine	280 (183.73)	Weight gain	2429.629 (1594.24)
Returns foregone	0	Reduced costs	
		Treatment	1013.332 (664.92)
		Death	3482.450 (2285.07)
Total	280 (183.73)		6925.411 (4544.23)
Modification of incomes due to vaccination			6645.411 (4360.50)
Benefit–cost ratio			23.73



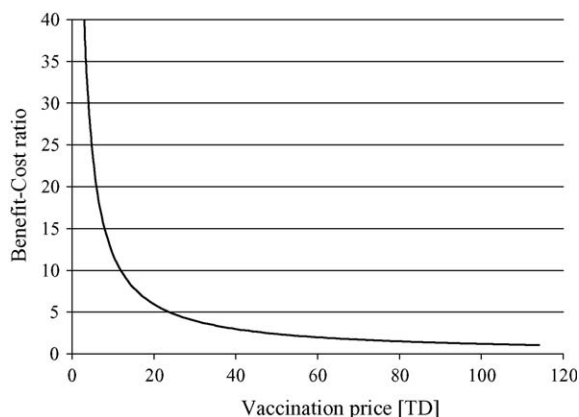


Fig. 2. Sensitivity analysis of the benefit–cost ratio (modification of the market price of the vaccine).

benefit–cost ratio ranged between 16.43 and 18.29 with a mean net benefit per vaccinated calf of 82.17–91.436 TD (€51.04–56.79). The sensitivity analysis was undertaken by analysing the effect of varying the price of a single vaccination (vaccine and veterinary fees) under the current situation, on the corresponding benefit–cost ratio. The results presented in Fig. 2 show that vaccination will not remain beneficial when the vaccination costs will be higher than 118 TD (€73.29).

#### 4. Discussion

This study was carried out in farms in endemic stability for two reasons: (i) the occurrence of an increasing clinical incidence in calves at first tropical theileriosis season since 1991 in such farms (Soudani, 1995; Karoui, 2002) and (ii) the presence of clinical and sub-clinical disease cases offering the opportunity to evaluate the economic importance of both types of infection.

This study was focused firstly on the evaluation of the economic impact of primary infection of calves with *T. annulata* and, secondly, on an estimation of the potential expected cost–benefit ratio of vaccination with a local attenuated vaccine.

The global prevalence of infection of calves (92.86%) associated to the restriction of clinical cases to this age category indicates the occurrence of a *T. annulata* transmission rate that is typical of the state of endemic stability (Darghouth et al., 1996b).

Previous studies carried out in farms in endemic stability for tropical theileriosis including the ones surveyed here showed that *H. detritum detritum* is by far the dominant species in summer season with more than 90% of the collected specimens by, respectively, Zarrouk (1994) and Bouattour et al. (1996). Our results are in accordance with this figure since *H. detritum detritum* was observed as the dominant tick species collected from sentinel cows (99.11%). The few ticks present on calves were not removed during the survey in order not to interfere with the transmission dynamic of *T. annulata*, particularly when considering the low prevalence of infection reported in the vector ticks (12.42%) (Bouattour et al., 1996). Furthermore, since these calves never graze, they are not exposed to the *Hyalomma* pasture ticks encountered in this region such as *H. marginatum marginatum* and *H. anatolicum excavatum*. Indeed, Bouattour (2001) has shown that these two last species are not encountered on cattle managed under zero-grazing system. All together these facts might justify to consider that the ticks counted during the summer season on lower body parts of the calves, which represent the specific fixation site of *Hyalomma* sp. genus, were belonging to *H. detritum detritum* species.

The tick numbers per animal season reported in this survey is by far higher on adult cows than on calves, i.e. a number of 14 and 323 for calves and cows, respectively. Similar results were observed by Bouattour et al. (1996) who estimated the number of ticks per animal season in five farms at the same village (El Hessienne) to range from 50 to more than 200 *H. detritum detritum* tick/adult cow season but only 9–11 *H. detritum detritum* ticks/calf season of less than 7 months age.

The relatively high clinical incidence of tropical theileriosis (42.86%) recorded over the 2 years survey is not a common figure in the context of typical endemic stability. In 1991, in the same farms, the clinical incidence in calves was 7.7% with the majority of calves being of local phenotype (Darghouth et al., 1996b). Over the period, 1994–2000, the prevalence of clinical disease has risen to 52% in association with an increase of the population of the Friesian–Holstein genotype in the three farms (Karoui, 2002). However, the infestation rate of ticks seems to have remained stable. Indeed, similar tick

infestation rates with *T. annulata* to those reported by Bouattour et al. (1996) in 1991 were observed after the disease incidence started to increase in 1994 (5.94–15.05% of infection in ticks) (Soudani, 1995; Zarrouk, 1994).

The major change that has occurred in the surveyed farms since 1991 is the introduction of the Friesian–Holstein genotype that has progressively replaced the local phenotype and resulted probably in a lower innate resistance to primary infection (Preston et al., 2002; Glass et al., 2005) and subsequently to an increase in the disease incidence which is not typical of endemic stability. Similar observations have also been recorded in other endemic countries and particularly in India after the implementation of a programme of genetic improvement of local cattle (Singh, 1991).

Bouattour et al. (1996) have shown that the peak of clinical cases of tropical theileriosis in an endemic region of Tunisia is following by 15 days the peak of *H. detritum detritum* activity. A similar pattern of evolution was also noted here indicating then that due to the low tick burden observed in calves, the highest risk for clinical cases of tropical theileriosis is associated to the peak of activity of the ticks.

Only clinical cases of tropical theileriosis, declared by the farmers, have been treated in order to obtain a situation as representative as possible of the usual health management level on the three farms. Despite the fact that calves were correctly treated (after thorough clinical and parasitological examination and rapid treatment with the appropriate drugs), the mortality reported in the present survey is surprisingly high (12.5%) by comparison with previous figures reported in the same farms (no lethal case in 1995 (0/28) (Soudani, 1995) and 4.54% (1/22) in 2000 (Karoui, 2002)). This is due to the occurrence in one of the farms of several laboratory confirmed clinical cases which were refractory to treatment despite early treatment. These cases of failure are probably caused by the occurrence of *T. annulata* strains resistant to buparvaquone observed in other farms of the same region (Naouach, 2001; Mhadhbi, 2004).

Total veterinary costs were estimated to be 1293.733 TD (€803.56) for the two theileriosis seasons in the three farms, with a mean cost per treated calf of 35.937 TD (€22.32).

The live weight increase was expressed using a relative variation calculated by reference to the initial live weight of the calves. This expression of the results was used for reducing the variability due to individual variations in growth rate (Guilhermet, 1988).

In calves which developed sub-clinical infections, a mean relative loss of 14.76% per infected calf was recorded, corresponding to a total cost of 7679.795 TD (€4770.06). Similarly, the mean relative weight losses due to clinical forms of tropical theileriosis were estimated to be 14.73% per case with a total cost of 4049.570 TD (€2515.32). In regard to the level weight of the calves surveyed in this study, these results are both much higher than those reported by Gitau et al. (2001) in clinical and sub-clinical cases of East Coast Fever in a *T. parva* endemic zone of Kenya with, respectively, 1.4 kg/case and no recorded live weight losses.

These differences could be explained by the dominance of the Holstein genotype in the surveyed calves. This breed seems to be more susceptible to infection with *T. annulata* than more resistant cattle like the Sahiwal breed (Preston et al., 1992) and less able to regulate immunosuppressor mechanisms activated in *T. annulata* infection (Preston et al., 2002). The Friesian–Holstein breed shows also prolonged production of alpha one acid glycoprotein ( $\alpha 1$  AGP) which is indicative for a chronic production of pro-inflammatory cytokines involved in the cachectic and anorexia response observed in tropical theileriosis (Glass et al., 2005).

The vaccination cost (5 TD; €3.1) used for the financial analysis of the control options is lower than the present cost of vaccination in Turkey, i.e. 8.932 TD (€5.55) (Karagenç, personal communication). This difference is due to the absence of cold chain in the delivery system set up in Tunisia. Indeed, the cost of the cold chain alone accounts for 30% of the vaccine cost (Bouslikhane et al., 1998).

The effect of vaccination on mortality rate and reduction of clinical cases incidence of tropical theileriosis is based on real figures obtained in a large field trial in Tunisia (Darghouth, 2004). Under experimental conditions, the expression of infection with *T. annulata* is dose dependent, with higher incidence of sub-clinical infection in animals exposed to low challenge doses (Preston et al., 1992). Furthermore, the efficacy of vaccination in preventing

disease expression using attenuated cell line vaccine was clearly reduced under experimental condition using lethal challenge dose (Darghouth et al., 1996a), while under field conditions the efficacy of the same attenuated lines used as fresh culture is around 90% (Darghouth et al., 1999). Taken together, these facts might justify to consider that vaccination will have more effect on the sub-clinical forms of infection which are probably consecutive to exposure to low challenges. This assumption was simulated here by considering that vaccination would reduce the financial impact of infection by translating the avoided clinical cases to sub-clinical infection with anaemia group, and reducing the occurrence of anaemia in sub-clinical infection group (Section 2.6).

Partial budgeting analysis permitted the estimation of the mean net benefit per vaccinated calf as 113.66 TD (€70.60) with a benefit–cost ratio of 23.7. Hence, vaccination of calves against tropical theileriosis appears economically well justified and highly profitable. In the current endemic situation of the farms, the cost–benefit ratio remains high even if we increase the vaccination costs dramatically to unrealistic values (decisional equivalent point at 118 TD (€73.29)). When the vaccine was applied to the original context of the three farms in 1991, with a particular low clinical incidence of 7.7%, the benefit–cost ratio of vaccination still remains high, ranging from 16.43 to 18.29. This result highlights the economic importance of sub-clinical infections in the state of endemic stability.

Our study shows that important changes are occurring within the state of endemic stability in Tunisia after the introduction of exotic cattle genotypes, resulting in the modification of morbidity parameters. These changes will also affect the financial impact of tropical theileriosis and subsequently the benefits associated to the implementation of control measures against infection. The evaluation in the present work of the unit losses induced by the different forms of primary infection with *T. annulata* represent a basic step towards a comprehensive financial assessment of control options against tropical theileriosis in endemic regions of Tunisia. The analysis reported here shows, in the context of endemic stability, the high financial return that could be potentially achieved by vaccination using a live attenuated cell line.

## Acknowledgements

This work was a part of a project funded by Institution de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur Agricoles (Ministère de l'Agriculture et des Ressources Hydrauliques, Tunisia) and Laboratoire d'Epidémiologie des Maladies Infectieuses, Parasitaires et Zoonotiques (Ministère de la Recherche Scientifique et de la Promotion des Compétences, Tunisia).

We are grateful to Dr. Moez Mhadhbi and Dr. Abdelkarim Krichi for their valuable collaboration in this work and to Prof. Andrew Tait and Prof. Mourad Rekek for helpful comments on the manuscript.

The authors would like to thank all the staff of the laboratory of parasitology (Jalel Arfaoui, Taoufik Lahmar and Béchir Guessmi) and the three farmers (Haj Hassine, Salah and Béchir) for their co-operation.

## References

- Bahri, S., Kallel, A., Gouia, A., 1995. La theilériose bovine en Tunisie, enquête rétrospective sur cinq années. Bull. Epidémiol. Inform. Vét. Institut. Rech. Vét. Tun. 5, 1–3.
- Blood, D.C., Radostitis, O.M. (Eds.), 1989. Veterinary Medicine. Baillière Tindall, London, 1502 pp.
- Bouattour, A., Darghouth, M.A., Ben Miled, L., 1996. Cattle infestation by *Hyalomma detritum* ticks and prevalence of *Theileria* in *Hyalomma detritum* species in Tunisia. Vet. Parasitol. 65, 256–263.
- Bouattour, A., 2001. Les tiques en Tunisie: rôle de *Hyalomma detritum* dans la transmission de *Theileria annulata*. Thèse ès Sciences biologiques. Faculté des sciences de Tunis, 247 pp.
- Bouslikhane, M., Kachani, M., Ouhelli, M., 1998. La theilériose bovine au Maroc, investigations épidémiologiques et étude de l'impact sur la productivité des élevages. Résumé de communication orale, 15<sup>ème</sup> congrès vétérinaire maghrébin, Hammamet, Tunisie, 5–6 mai.
- Darghouth, M.A., Ben Miled, L., Bouattour, A., Melrose, T.R., Brown, C.G.D., Kilani, M., 1996a. A preliminary study on the attenuation of Tunisian schizont infected cell lines of *Theileria annulata*. Parasitol. Res. 82, 647–655.
- Darghouth, M.A., Bouattour, A., Ben Miled, L., Kilani, M., Brown, C.G.D., 1996b. Epidemiology of tropical theileriosis (*Theileria annulata* infection of cattle) in an endemic region of Tunisia: characterisation of endemicity states. Vet. Parasitol. 65, 199–211.
- Darghouth, M.A., Bouattour, A., Ben Miled, L., Sassi, L., 1996c. Diagnosis of *Theileria annulata* infection of cattle in Tunisia: comparison of serology and blood smears. Vet. Res. 27, 613–621.

- Darghouth, M.A., Bouattour, A., Kilani, M., 1999. Tropical theileriosis in Tunisia: epidemiology and control. *Parassitologia* 41 (Suppl. 1), 33–36.
- Darghouth, M.A., Kilani, M., Bouattour, A., 2003. Les theilérioses. In: Lefèvre, P.C., Provost, A., Blancou, J. (Eds.), *Les maladies infectieuses et parasitaires du bétail des régions chaudes*. Masson, Paris, pp. 1585–1603.
- Darghouth, M.A., 2004. Prévention de la theilériose tropicale en Tunisie: lutte acaricide et vaccination. Comptes rendus des 11<sup>èmes</sup> journées de l’institution de la recherche et de l’enseignement supérieur agricoles, 18 et 19 December. Hammamet, Tunisie.
- Darghouth, M.A., Sassi, L., Gharbi, M., Soudani, M.C., Karoui, M., Krichi, A., 2004. Detection of naturally infections with *Theileria annulata* on calves at first theileriosis season: comparison of the indirect fluorescence antibody test (IFAT) and blood smears. *Arch. Inst. Pasteur Tunis* (1–4), 41–45.
- Dijkhuizen, A.A., Morris, R.S., 1997. *Animal Health Economics: Principles and Applications*. Post-Graduate Foundation in Veterinary Science, Sydney, 305 pp.
- Dodo, K., Pandey, V.S., Illiassou, M.S., 2001. Utilisation de la barymétrie pour l’estimation du poids chez le zébu Azawak au Niger. *Rev. Elevage Méd. Vét. Pays Trop.* 54, 63–68.
- Gitau, G.K., McDermott, J.J., McDermott, B., Perry, B.D., 2001. The impact of *Theileria parva* infections and other factors on calf mean daily weight gains in smallholders farms in Murang District, Kenya. *Prev. Vet. Med.* 51, 149–160.
- Glass, E.J., Preston, P.M., Springbett, A., Craigmile, S., Kirvar, E., Wilkie, G., Brown, C.G., 2005. *Bos taurus* and *Bos indicus* (Sahiwal) calves respond differently to infection with *Theileria annulata* and produce markedly different levels of acute phase proteins. *Int. J. Parasitol.* 35, 337–347.
- Grenier, B., 1996. Evaluation de la décision médicale: introduction à l’analyse médico-économique. Masson, Paris, 412 pp.
- Guilhermet, R., 1988. *Techniques Agricoles Volume: productions animales. Bases physiologiques de la production de viande bovine: croissance et développement*, Editions Techniques, Paris 3358, pp. 1–17.
- Karoui, M., 2002. Suivi de l’infection sur les veaux en première saison de theilériose tropicale dans l’état d’endémie stable: application à l’évaluation de l’intérêt de la vaccination contre la theilériose tropicale, Thèse Doc. Méd. Vét., Sidi Thabet, Tunisie, 68 pp.
- Mhadhbi, M., 2004. Caractérisation génétique des isolats tunisiens de *Theileria annulata* potentiellement résistants à la buparvaquone par électrophorèse isoenzymatique. Diplôme de Mastère en génétique et biologie moléculaire. Faculté des sciences de Tunis, Tunisie, 51 pp.
- Minjaw, B., McLeod, A., 2003. *Tick-Born Diseases and Poverty: The Impact of Ticks and Tick-Born Disease on the Livelihoods of Small-Scale and Marginal Livestock Owners in India and Eastern and Southern Africa*. Research Report, DFID Animal Health Programme. Centre of Tropical Veterinary Medicine, University of Edinburgh, United Kingdom, 116 pp.
- Moll, G., Lohding, A., Young, A.S., Leitch, B.L., 1987. Epidemiology of theileriosis in calves in an endemic area of Kenya. *Vet. Parasitol.* 19, 255–273.
- Naouach, A., 2001. Evaluation de l’effet de la buparvaquone sur deux souches ST1/13 et ST2/19 de *Theileria annulata* potentiellement résistantes. Thèse Doc. Méd. Vét., Sidi Thabet, Tunisie, 69 pp.
- OIE, 2005. Theileriosis. In: *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*, [http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A\\_00062.htm](http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_00062.htm) (Chapter 2.3.11, consulted 22 February 2005).
- Preston, P.M., Brown, C.G.D., Bell-Sakyi, L., Richardson, W., Sanderson, A., 1992. Tropical theileriosis in *Bos taurus* and *Bos indicus*: response to infection with graded doses of sporozoites of *Theileria annulata*. *Res. Vet. Sci.* 53, 230–243.
- Preston, P.M., Darghouth, M.A., Boulter, N.R., Hall, F.R., Tall, R., Kirvar, E., Brown, D.C.G., 2002. A dual role for immunosuppressor mechanisms in infection with *Theileria annulata*: well-regulated suppressor macrophages help in recovery from infection; profound immunosuppression promotes non-healing disease. *Parasitol. Res.* 88, 522–534.
- SAS, 1991. *User’s Guide*, Version 6.10. SAS Institute, Inc., Cary, NC, 1686 pp.
- Singh, D.K., 1991. Theileriosis in India. In: Singh, D.K., Varshney, B.C. (Eds.), *Proceedings of Second EEC Workshop on Orientation and Co-ordination of Research on Tropical Theileriosis*, National Dairy Development Board, Anand, India, pp. 23–28.
- Soudani, M.C., 1995. Contribution à l’étude épidémiologique de la theilériose bovine à *Theileria annulata*: analyse clinique, parasitologique et sérologique de l’infection naturelle des veaux en première saison estivale, Thèse Doc. Méd. Vét., Sidi Thabet, Tunisia, 68 pp.
- Tisdell, C.A., Harrison, S.R., Ramsay, G.C., 1999. The economic impact of endemic diseases and disease control programmes. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 18, 380–398.
- Toma, B., Dufour, B., Sanaa, M., Bénét, J.J., Shaw, A., Moutou, F., Louzà, A., 2001. *Epidémiologie appliquée à la lute collective contre les maladies animales transmissibles majeures*. Association d’épidémiologie et d’étude des maladies animales, Paris, 696 pp.
- Tunisian Ministry of Agriculture, 1995. *Enquête sur la structure des exploitations agricoles*. Direction générale de la planification et du développement de l’investissement agricole, Tunisie, 31 pp.
- Walker, A.R., Bouattour, A., Camicas, J.-L., Estrada-Peña, A., Horak, I.G., Latif, A.A., Pegram, R.G., Preston, P.M., 2003. *Ticks of Domestic Animals in Africa*. Bioscience Reports. Edinburgh, UK, 221 pp.
- Zarrouk, A., 1994. Etude du polymorphisme de *Theileria annulata* dans une étable à situation endémique stable par la Glucose Phosphate Isomérase. Diplôme d’études approfondies en biologie moléculaire et génie génétique. Faculté des sciences de Tunis, Tunisia, 89 pp.

# Discussion de l'article

## **-I- Introduction**

La lutte rationnelle contre les problèmes de santé doit toujours être basée sur des études épidémiologiques et économiques de terrain et à défaut, des modèles théoriques simulant la réalité, doivent être développés (Dufour, 2000). Les études économiques nécessitent des données épidémiologiques fiables basées sur des enquêtes de terrain. Ces données peuvent avoir plusieurs origines : recueil passif, système de surveillance épidémiologique, études d'observation, études expérimentales et la construction de modèles (Perry et al., 2001). Les enquêtes longitudinales offrent la meilleure fiabilité (Billiow et al., 2002) car elles permettent de recueillir des données complètes, non biaisées et précises (Rumeau Rouquette et al., 1993).

En Tunisie, les études relatives à l'impact des maladies (aussi bien humaines qu'animales) sont disparates et fragmentaires. Les problèmes de sous-estimation et de manque d'information font que les décideurs en santé animale se trouvent démunis de critères de décisions objectifs et précis.

## **-II- Analyse financière**

Dans le présent travail, seuls les aspects financiers inhérents aux coûts directs ont été comptabilisés. Par contre, les coûts indirects et les coûts intangibles n'ont pas été comptabilisés malgré le fait qu'ils soient réels. Minjauw et McLeod (2003) classent les sources de revenus des éleveurs en 5 capitaux : naturel, social, humain, physique et financier, ils sont affectés par les maladies animales de

manière variable. Par exemple, il est établi que la survenue de maladies dans des élevages peut être à l'origine de la dissémination de l'élevage et la conversion de l'éleveur vers d'autres activités voire le contraindre à l'exode rural.

De même, l'impact des maladies animales sur le bien être de l'éleveur, de sa famille et même des animaux est parfois important (Morris, 1997). Reste la question méthodologique fondamentale : comment quantifier ou objectiver ce mal être qui demeure un concept abstrait (Anonyme, 1996) ?

En définitive, dans le contexte d'élevage tunisien de type traditionnel, tout comme dans les autres pays en développement, il est très important de prendre en considération trois coûts non chiffrables : (i) L'impact social et le bien être de l'éleveur. D'une part, posséder des animaux représente une source de considération sociale. D'autre part, il existe une solide relation affective entre l'éleveur et ses animaux. Pour les petits éleveurs, la survenue de plusieurs cas de theilériose tropicale représente assez souvent un argument pour l'exode rural. (ii) Les ressources génétiques sont très affectées par les maladies d'une façon générale. En effet, la Tunisie importe les génisses gestantes ce qui est consommateur en devise. (iii) Il est également important de considérer le fait que la theilériose tropicale (notamment le portage chronique du pathogène) pourrait prédisposer les animaux à d'autres affections.

Notre travail nous a permis d'évaluer des indicateurs financiers spécifiques à la theilériose des veaux pouvant être extrapolés à d'autres états endémiques : les formes asymptomatiques d'infection des veaux coûtent entre 239,165 DT (148,55 €) et 304,710 DT (189,26 €). Le coût des formes cliniques a été estimé à 286,287 DT (177,82 €) en présence d'un taux de mortalités de 12,5 p. cent. La part des pertes relatives aux formes asymptomatiques représente 50,8 p. cent du coût total de la theilériose tropicale.

L'analyse par budgétisation partielle (Rushton et al., 1999) a permis d'estimer le bénéfice net moyen par veau vacciné à 113,66 DT (70,60 €) avec un ratio bénéfice – coût de la vaccination estimé à 23,7. La vaccination des veaux en

situation d'endémie stable est économiquement justifiée avec des bénéfices qui représentent environ 20 p. cent du prix d'un veau pesant 100 Kg. Le ratio coût – bénéfice estimé dans notre étude est beaucoup plus grand que celui estimé par Touay (2005) qui l'a estimé dans des étables en situation d'endémie instable à 1/2,77. Cette différence serait due au fait que l'intensité d'infestation par les tiques, et par conséquent les risques d'infection des bovins, est de loin plus importante dans la *situation d'endémie stable ciblée ici que dans la situation d'endémie instable*.

### **-III- Analyse financière à l'échelle nationale**

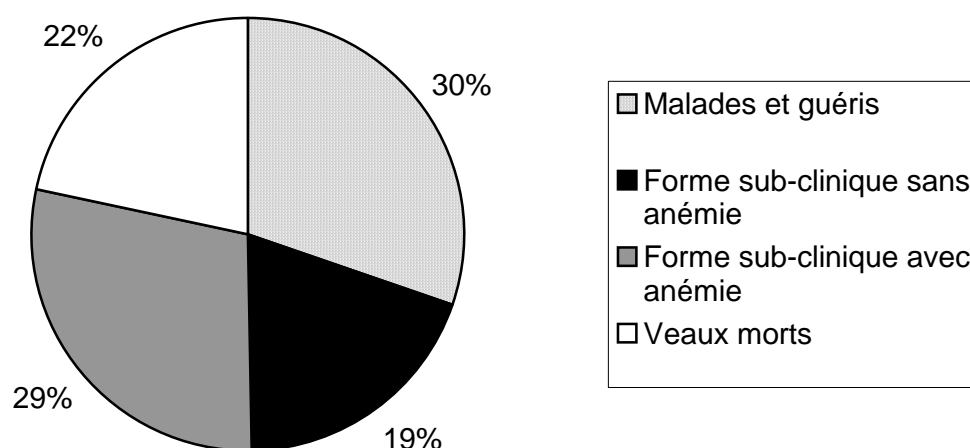
Aucune étude n'a concerné l'estimation de l'impact financier de la theilériose tropicale à l'échelle nationale et ce aussi bien en Tunisie que dans les autres pays d'endémie. Dans ce qui suit, nous allons estimer ces coûts dans les élevages en situation d'endémie stable, en considérant d'une part que 3,8 p. cent des élevages se trouvent dans ce type endémique comme l'ont révélé des enquêtes conduites sur des échantillons représentatifs d'étables provenant des étages bioclimatiques sub-humides et semi-arides du pays où se concentrent la majorité des cas de theilériose (Darghouth et al., 1996 et 2003), et en tenant compte d'autre part de la taille moyenne d'une étable du secteur non organisé soit 10 vaches et du nombre d'étables recensées en Tunisie, soit 15.100 (Ministère de l'Agriculture et des Ressources Hydrauliques, 2002). Sur ces bases, les étables potentiellement en état d'endémie stable de theilériose totaliseraient 28.601 vaches et 6.643 veaux, soit en moyenne 4,3 veaux par vache (Ministère de l'Agriculture et des Ressources Hydrauliques, 2002). De ce fait, le coût total annuel de la theilériose tropicale pour les veaux en situation d'endémie stable en Tunisie serait de 2.047.676,530 DT (1.271.851,44 €) (Tableau I).

**Tableau I**  
**Estimation de l'impact de la theilériose tropicale à l'échelle nationale**

Item	Malades et guéris	Cas sub-cliniques		Veaux morts	Total
		Sans anémie	Avec anémie		
Effectif essai <sup>1</sup>	17	13	15	7	
Effectif de veaux en Tunisie <sup>2</sup>	2.172	1.661	1.916	894	6.643
Pertes par veau présent en DT (€)	86,908 (53,98)	55,520 (34,48)	81,619 (50,70)	62,186 (38,62)	
Coût total en DT (€)	621.729,403 (386.168,14)	397.183,418 (246.698,29)	583.892,532 (362.666,93)	444.871,182 (276.318,08)	2.047.676,530 (1.271.851,44)

1. Gharbi et al. 2006

2. Ministère de l'Agriculture et des Ressources Hydrauliques, Tunisie, 2002



**Figure 1**  
**Répartition des pertes en fonction de la forme clinique de theilériose tropicale en Tunisie**

La Figure 1 montre qu'environ la moitié des pertes sont en fait dues aux formes sub-cliniques. Les résultats obtenus, soit des pertes de l'ordre de 2 millions de dinars tunisiens découlent en fait de l'extrapolation des conditions



épidémiologiques observées dans les étables suivies à l'ensemble des troupeaux en endémie stable. Ainsi, pour plus de fiabilité, il est nécessaire de disposer de données démographiques précises basées sur des enquêtes de terrain ayant une bonne base de sondage, en grappe par exemple (Rumeau Rouquette et al., 1993). De plus, une enquête nationale estimant la distribution des types épidémiologiques de theilériose tropicale sur tout le territoire tunisien sera aussi d'un grand apport. Néanmoins, et malgré ces limites, l'approche suivie ici a le mérite de révéler, au travers du niveau des pertes enregistrées, la gravité de l'impact économique de la theilériose dans un état endémique et une catégorie d'âge à risque non dominants en Tunisie. Il est donc pratiquement certain que les pertes globales dues à l'infection par *T. annulata* seront nettement plus élevées en Tunisie, et ce aussi bien dans l'état d'endémie stable que dans celui instable.

#### **-IV- Etude financière du crépissage des murs**

La vaccination contre la theilériose tropicale représente un moyen de lutte qui permet de réduire efficacement l'incidence des formes cliniques de theilériose. Néanmoins, l'application de cette mesure de lutte ne peut prétendre à une éradication de la maladie. En effet, le vaccin contre la theilériose tropicale est un vaccin contre la maladie et non contre l'infection (Darghouth et al., 2003). La prévalence des formes de portage asymptomatique n'est très certainement pas affectée par le vaccin, or ce sont ces animaux qui représentent une source d'infection des tiques immatures et donc d'entretien du cycle épidémiologique. Par conséquent, la vaccination est une mesure d'accompagnement qui doit s'intégrer dans une stratégie de lutte plus large visant l'éradication du vecteur et donc celle de *T. annulata*. Cette dernière mesure n'est possible que si un programme national (ou du moins régional) de mise à niveau des étables est mis en place. Le crépissage des murs des bâtiments d'élevage (face externe, interne ainsi que le plafond) et le nettoyage de l'étable et de son périmètre représentent le pilier de ce programme.

Nous allons présenter dans ce qui suit, une étude complémentaire relative au ratio bénéfice-coût de la mise à niveau des trois étables suivies. Cette mise à niveau consiste en un crépissage des murs des trois étables.

Les étables ont été visitées et les murs ainsi que les piliers les supportant ont été mesurés. Le calcul du coût du crépissage a été basé sur les valeurs 2005 de la main d'œuvre et des matériaux de construction par m<sup>2</sup> de mur crépis (Tableau II).

**Tableau II**  
**Calcul du coût du crépissage des trois étables**

Item	Elevage 1	Elevage 2	Elevage 3	Total
<b>Superficie totale (m<sup>2</sup>)</b>	214,020	173,31	989,170	1.376,510
<i>Prix total du crépissage en DT (€)</i>	642,085	519,936	3.339	4.501,021
<i>Coût annuel du crépissage* en DT (€)</i>	(398,81)	(322,94)	(2.073,92)	(2.795,67)
	42,810	34,662	222,600	300,072
	(26,59)	(21,53)	(138,26)	(186,38)

\* Calcul du coût annuel du crépissage basé sur un calcul d'amortissement linéaire de 15 ans. La valeur résiduelle du crépissage est nulle.

En considérant le coût total de l'infection de veaux par *T. annulata* (toutes formes d'infection confondues) soit 15.115,058 TD (9.388,25 €), le ratio bénéfice-coût sans considération de l'amortissement du crépissage serait de 3,36. En prenant en considération l'amortissement (ce qui est plus correct d'un point de vue comptable), ce ratio serait de 50,37. En effet, si le crépissage est correctement réalisé, il serait logique de considérer que la population de tiques vecteur sera rapidement éradiquée entraînant ainsi l'absence d'exposition des veaux à l'infection par *T. annulata*. Le ratio calculé, soit 50,37 est nettement supérieur au ratio bénéfice coût de la vaccination (23,7), ces résultats rejoignent ceux de Touay (2005) qui a montré que dans les élevages de bovins laitiers en état d'endémie instable de theilériose, le crépissage des murs génère un ratio coût –bénéfice plus de 2 fois supérieur à celui de la vaccination. En effet, cette action de santé diffère du crépissage par trois éléments importants : (i) La vaccination doit toucher chaque animal alors que le crépissage est une action collective. (ii) Le crépissage est amortissable sur 15 ans (au moins), alors que la vaccination est une action

annuelle. (iii) La vaccination est une action qui protège contre les cas cliniques, mais pas contre les formes sub-cliniques, alors que le crépissage éradique le parasite. De plus, il est important de souligner que le bénéfice apporté par le crépissage est sous estimé ici, et ce pour quatre raisons : (i) L'action pathogène directe des tiques n'a pas été prise en considération. Cette action est beaucoup plus importante chez les adultes que chez les veaux du fait de la différence de l'intensité d'infestation. (ii) L'effet de l'éradication de la tique et donc de la theilériose tropicale chez les adultes n'a pas été comptabilisé, or dans les étables suivies, tous les adultes étaient des infectés inapparents, ce qui entraîne une diminution insidieuse de la production laitière. Cette perte a été estimée par Singh (1991) à environ 1,4 l par jour. (iii) Le coût des acaricides n'a pas été comptabilisé car si la tique est éradiquée l'utilisation des acaricides ainsi que les précautions qu'ils imposent (délai d'attente et de retrait pour la viande et le lait) n'ont plus de raison d'être. (iv) Le bénéfice sanitaire du crépissage des murs, qui deviennent de ce fait plus facile à nettoyer, concerne aussi d'autres maladies d'étables fréquentes en Tunisie, comme les mammites, la tuberculose...

#### **-V- Limites de la lutte contre la tique vecteur**

La lutte acaricide est exécutée par l'éleveur, c'est pour cette raison que dans ces programmes de lutte, il faut adopter une approche participative basée sur la sensibilisation et l'information. Même si la tique vecteur est endophile, il existe une possibilité de transmission entre élevages limitrophes, et donc des externalités négatives entre voisins. Cette situation pose l'intérêt d'une réflexion sur la mise en place d'un programme établi à l'échelle nationale ou du moins régionale ou collective.

La lutte contre la tique connaît en Tunisie plusieurs limites :

- En Tunisie, et comme dans plusieurs pays en développement, le niveau d'instruction des éleveurs est très faible. Une étude réalisée au nord de la Tunisie, a montré que 87,5 p. cent des éleveurs touchés par la theilériose tropicale ont un

niveau d'instruction primaire. Par contre, dans les élevages indemnes, ce taux est de 57 p. cent (Karoui, 2005) (différence statistiquement significative au risque de 5 p. cent). Ce très faible niveau d'instruction influence indiscutablement la perception de la maladie par les éleveurs et l'efficacité de réception du message des vulgarisateurs ainsi que l'effectivité de la lutte.

- Le rôle vectoriel de la tique dans la transmission de la theilériose tropicale est un fait qui n'a pas été intégré par tous les éleveurs. Dans une étude réalisée par Karoui (2005), uniquement 43,33 p. cent (13/30) des éleveurs pensent que la theilériose tropicale est due à la tique. De plus, 100 p. cent des éleveurs pensent que la tique provient des pâturages (Chaari, 2004).

- Le détiqage manuel est effectué par certains éleveurs, mais il reste d'efficacité incomplète du fait de la localisation de *Hyalomma detritum* dans des régions anatomiques difficiles à inspecter.

- Le crépissage des murs est un facteur de réussite capital dans la lutte contre la theilériose tropicale. Les animaux maintenus dans des élevages à enduit lisse sont significativement moins exposés à la theilériose tropicale que ceux maintenus dans des étables avec des enduits rugueux (OR = 60,66) (Karoui, 2005) (Tableau III).

**Tableau III**

**Nature de l'enduit dans les locaux d'élevage en fonction de la présence ou de l'absence de la theilériose tropicale (Karoui, 2005)**

<b>Nature de l'enduit des surfaces internes des murs</b>	<b>Élevages infectés</b>	<b>Élevages indemnes</b>
<i>Enduit rugueux</i>	26/32 (75 %)	2/30 (6,66 %)
<i>Enduit lisse</i>	6/32 (18,75 %)	28/30 (93,33 %)

Différence significative au risque de 5 p. cent (test exact de Yates).

Odds ratio = 60,66. Intervalle de confiance à 95 p. cent = [11,23 ; 327,83].

La présence de crevasses est un facteur de risque car ils représentent des gîtes pour l'hibernation de la nymphe et sa mue en adulte. Ce facteur serait

emboîté dans le facteur nature de l'enduit. Néanmoins, certains enduits peuvent être rugueux sans qu'il y ait pour autant des crevasses. L'inverse est tout à fait vrai (Tableau IV).

**Tableau IV**

**Présence de crevasses dans les bâtiments en fonction de la présence ou de l'absence de cas cliniques de theilériose tropicale (Karoui, 2005)**

	Élevages infectés	Élevages indemnes
Présence de crevasse	25/31 (80,64 %)	4/30 (13,33 %)
Absence de crevasse	6/31 (19,36 %)	26/30 (86,66 %)

Différence significative (chi deux à 1 ddl  $p < 1\%$ ).

Odds ratio = 27,08. Intervalle de confiance à 95 p. cent = [6,82 ; 107,56].

- L'utilisation rationnelle d'acaricides n'est pas toujours pratiquée par les éleveurs. Ainsi, 71,87 p. cent (23/32) des éleveurs utilisent l'acaricide et le gardent pour un usage ultérieure (Karoui, 2005). La protection du manipulateur est un concept qui n'est pas intégré dans les traditions. En effet, 90,62 p. cent (29/32) des éleveurs ne se protègent pas lors de l'application d'acaricides (Karoui, 2005). La même enquête montre que 51,12 p. cent (17/32) effectuent un traitement acaricide d'été exclusivement. Or, c'est le traitement d'automne qui permet d'éradiquer la tique et par conséquent éradiquer la theilériose tropicale de l'élevage (Darghouth, 2000). Cette différence d'efficacité est due au fait que les juvéniles (larves et nymphes) se fixent pendant une plus longue période sur les bovins que les adultes.

## **-VI- Conclusion**

Notre étude montre que des changements radicaux sont entrain de se réaliser dans les élevages en situation d'endémie stable à la theilériose tropicale. Ce phénomène est observé suite à l'introduction de génotype exotique d'où une modification des indicateurs de morbidité. Ces changements vont également affecter l'impact financier de la theilériose tropicale et par conséquent les bénéfices associés à l'application des mesures de lutte contre cette infection. L'évaluation dans ce présent travail des pertes unitaires dans différentes formes d'infection par *T. annulata* représente une étape préliminaire pour une évaluation des différentes options de lutte contre la theilériose tropicale dans les régions endémiques en

Tunisie. L'analyse présentée dans ce travail, dans le contexte d'endémie stable, montre les bénéfices qui peuvent être dégagés en utilisant un vaccin atténué.

Actuellement, l'éleveur tunisien est réceptif à l'idée de faire vacciner ses animaux contre la theilériose tropicale. En effet, la campagne de vaccination pilote menée par le Laboratoire de Parasitologie de l'Ecole Nationale de Médecine Vétérinaire de Sidi Thabet dans les Gouvernorats de Bèjà (Nord ouest de la Tunisie) et de l'Ariana (Nord) a été très favorablement accueillie par les éleveurs. Les éleveurs dont les animaux ont été vaccinés, se sont rendus compte que l'incidence des cas cliniques a diminué de manière manifeste.

L'étude de l'impact économique (aussi bien ses aspects tangibles qu'intangibles) représente la première étape qui permet de mettre à la disposition des décideurs en santé animale un outil d'aide à la décision qui sera utilisé dans la planification de la lutte contre la theilériose tropicale bovine en Tunisie. En effet, les alternatives offertes pour la lutte contre la theilériose sont multiples et le choix de la meilleure méthode doit se baser sur des critères d'efficacité, mais aussi de coût et d'acceptabilité. Cette étude a permis d'estimer l'impact financier des formes sub-cliniques de la theilériose tropicale qui est assez souvent sous-estimé, car il n'est pas tangible et ce malgré le fait que ces pertes soient élevées : 37 p. cent des coûts unitaires. De plus, le ratio coût-bénéfice de la vaccination dans les élevages en situation d'endémie stable est largement en faveur de l'application de la vaccination dans ces élevages et ce même si son prix dépasse les 100 DT (62,11 €) ce qui est une hypothèse peu probable pour un vaccin à base de culture cellulaire.

Afin de permettre la mise en place de constructions économiques précises et adaptées au contexte tunisien, il serait intéressant d'appliquer la même méthodologie pour l'estimation du coût de la maladie dans la situation d'endémie instable où principalement les vaches laitières sont touchées par la maladie. Or, la theilériose tropicale a un impact très important sur la production laitière (M'barek, 1994). Par conséquent, la vaccination sera d'un grand apport puisqu'il s'agit d'un vaccin contre l'expression clinique de la maladie. De plus, les formes cliniques sont à l'origine de chutes de la production laitière remarquables qui seraient plus

importantes que celles consécutives à la maladie. Des essais de vaccination réalisés dans la région de Sidi Thabet ont démontré que la production laitière est améliorée durant la saison estivale chez les vaches vaccinées par rapport aux vaches non vaccinées (Darghouth, non publié).

Toutes ces études permettraient d'apporter des outils primordiaux pour l'aide à la décision en matière de lutte contre la theilériose tropicale. Dans une étape ultérieure, il serait possible de compiler les données épidémiologiques et économétriques pour construire des modèles de lutte standard adaptés à chaque contexte épidémiologique voire à chaque élevage.

## Références

- [1] Anonyme. 1996. Economics and welfare. Vet. Record. 7 : 145.
- [2] Bahri S., Kallel A., Gouia A. 1995. La theilériose bovine en Tunisie, enquête rétrospective sur cinq années. Bull. Epidémiol. Inform. Vét. Institut. Rech. Vét. Tun. 5 : 1 – 3.
- [3] Billiouw M., Vercruysse J., Marcotty T., Speybroeck N., Chaka G., Berkvens D. 2002. *Theileria parva* epidemics: a case study in eastern Zambia. Vet. Parasitol. 107: 51-63.
- [4] Chaari S. 2004. Enquête sur la theilériose tropicale dans la basse vallée de la Medjerda : perception de la maladie et application de la lutte acaricide. Mémoire pour l'obtention du Diplôme d'Etudes Supérieures Spécialisée en Epidémiologie Animale. Ecole Nationale de Médecine Vétérinaire de Sidi Thabet, 27 pp.
- [5] Darghouth M.A., Bouattour A., Ben Miled L., Kilani M., Brown C.G.D. 1996. Epidemiology of tropical theileriosis (*Theileria annulata* infection of cattle) in an endemic region of Tunisia: characterisation of endemicity states. Vet. Parasitol. 65: 199-211.
- [6] Darghouth M.A. 2000. La theilériose tropicale des bovins (*Theileria annulata*) en Tunisie : Caractérisation des états d'endémie et développement de lignées leucocytaires infectées de schizontes atténués. Thèse de troisième cycle. Institut Polytechnique de Toulouse. 242 pp.
- [7] Darghouth M.A., Kilani M., Bouattour A. 2003. Les theilérioses. In: Les maladies infectieuses et parasitaires du bétail des régions chaudes, Editeurs Lefèvre, P.C., Provost A., et Blancou, J. Ed. Masson, Paris. 1585-1603.



- [8] Darghouth M.A. 2004. Prévention de la theilériose tropicale en Tunisie : lutte acaricide et vaccination. Comptes rendus des 11 èmes journées de l'institution de la recherche et de l'enseignement supérieur agricoles. 18 et 19 Décembre 2004, Hammamet, Tunisie.
- [9] Dufour B., La Vieille S. 2000. Epidemiological surveillance of infectious diseases in France. *Vet. Res.* 31 : 169-185.
- [10] Gautam O.P. 1981. Bovine tropical theileriosis and it's control. *In* Irvin A.D., Cunningham M.P., Young A.S. (Editeurs) *Advances in the control of theileriosis*. Ed. Martinus Nijhoff Publishers, The Hague. 262-265.
- [11] Gharbi M., Sassi L., Dorchies P., Darghouth P. 2006. Infection of calves with *Theileria annulata* : economic analysis and evaluation of potential benefit of vaccination. *Accepté, Vet. Parasitol.*
- [12] Gill B.S., Bhattacharyulu Y., Kaur D., Singh A., 1981. Immunization of cattle against *Theileria annulata*: a resume of work done at Punjab agricultural university, Ludhiana. *In* Irvin A.D. Cunningham M.P., Young A.S. (Editeurs.) *Advances in the control of theileriosis*. Ed. Martinus Nijhoff Publishers, The Hague. 259-261.
- [13] Karoui A. 2005. Enquête sur la theilériose tropicale dans la région de la basse vallée de la Medjerda : perception de la maladie et application de la lutte acaricide par l'éleveur. Thèse de doctorat en médecine vétérinaire de Sidi Thabet. 54 pp.
- [14] M'barek M. 1994. Incidence de la theilériose sur la production laitière bovine : essai d'estimation préliminaire dans la région Nord-Est de la basse vallée de la Medjerda. Thèse Doct. Méd. Vét., Sidi Thabet. 62 pp.
- [15] Ministère de l'agriculture et des ressources hydrauliques, Tunisie. 2002. Statistiques annuelles.
- [16] Minjaw B., McLeod A. 2003. Tick-borne diseases and poverty. The impact of ticks and tick-borne disease on the livelihoods of small-scale and marginal livestock owners in India and Eastern and Southern Africa. Research report, DFID animal health programme, Centre of Tropical Veterinary Medicine. University of Edinburgh, UK, 116 pp.
- [17] Morris R.S. 1997. How economically important is animal disease and why? *In* Dijkhuizen A.A., Morris R.S. (Editors), *Animal health economics*:

- principles and application. Ed. Post graduate foundation publication. 1-11.
- [18] Morris R.S. 1999. The application of economics in animal health programmes : a practical guide. Rev. Sci. Tech. 18 (2):305-14.
- [19] Ozkoc U., Pipano E. 1981. Trials with cell culture vaccine against theileriosis in Turkey. *In* Irvin A.D. Cunningham M.P., Young A.S. (Editeurs) Advances in the control of theileriosis. Ed. Martinus Nijhoff Publishers, The Hague. 256-258.
- [20] Perry B., McDermott J., Randolph T. 2001. Can epidemiology and economics make a meaningful contribution to national animal-disease control ? Prev. Vet. Med. 48: 231-260.
- [21] Perry B.D., Randolph T.F. 1999. Improving the assessment of the economic impact of parasitic diseases and of their control in production animals. Vet. Parasitol. 84: 145–168.
- [22] Rumeau Rouquette C., Blondel B., Kaminski M., Bréart G. 1993. Epidémiologie : méthodes et pratiques. Ed. Flammarion Médecine-Sciences. 312 pp.
- [23] Rushton J., Thornton P. K., Otte M. J. 1999. Methods of economic impact assessment. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. 18 (2): 315 - 342.
- [24] Samish M., Pipano E. 1981. Preparation and application of *Theileria annulata* infected stabilate. *In* : Irvin A.D. Cunningham M.P., Young A.S. (Editeurs) Advances in the control of theileriosis. Ed. Martinus Nijhoff Publishers, The Hague. 253-255.
- [25] Singh D.K., Varshney B.C., Raghav P.R.S., Thakur M. 1993. Response of crossbred calves to immunization with *Theileria annulata* schizont infected lymphoid cells cultures. Indian Vet. J. 70: 605-608.
- [26] Singh D.K, 1991. Theileriosis in India, *In* : Singh, D.K. and Varshney, B.C. (Editeurs), Proc. second EEC workshop on orientation and co-ordination of research on tropical theileriosis, national dairy development board, Anand, India, pp. 23-28.
- [27] Touay A. 2005. Evaluation de l'impact économique de la theilériose tropicale à partir d'u échantillon de 49 cas confirmés de maladie, application à une évaluation du ratio coût – bénéfice de la vaccination et du crépissage des

locaux d'élevage. Thèse de doctorat en médecine vétérinaire de Sidi Thabet. 47 pp.

## Deuxième partie expérimentale :

Induction d'une protection relative contre une infection d'épreuve létale par *Theileria annulata* après vaccination de veaux par les antigènes Tams et SPAG-1 administrés par « *prime – boost* » hétérologue. Effet synergique de l'association Tams-SPAG-1

## Présentation générale

La vaccination par des parasites vivants atténués contre la theilériose tropicale représente à ce jour une des principales modalités pratique de prévention contre cette parasitose. Nous avons choisi d'étudier dans ce travail l'intérêt économique de cette mesure de lutte en conduisant dans une première étape une analyse financière relative à l'impact de la theilériose tropicale sur des veaux provenant d'élevages en situation d'endémie stable à la theilériose tropicale. Cette analyse nous a par la suite permit d'évaluer l'intérêt financier de la vaccination par une souche atténuée autochtone de *T. annulata*. Ce travail a fait l'objet d'une publication dans *Veterinary Parasitology*.

Les contraintes d'ordre technique associées à l'utilisation de vaccins vivants atténués ont motivés la recherche vers la mise au point de vaccins sous unitaires inactivés. Cette orientation a permis d'isoler et de cloner des antigènes parasitaires des stades sporozoïtes, schizontes et mérozoïtes de *T. annulata*. Nous avons choisis ici d'évaluer une nouvelle stratégie de routage antigénique basée sur l'utilisation d'ADN parasitaires suivant l'approche « *prime-boost* ». Dans ce contexte, des antigènes des stades sporozoïtes (SPAG-1), schizontes (CL 10, Tash AT3, Tash HN et PIM) et mérozoïtes (Tams) de *T. annulata* ont été évalués dans deux essais de vaccination utilisant cette nouvelle approche.

## Introduction

Malgré l'impact économique indéniable de la theilériose tropicale et sa large distribution géographique ainsi que l'utilisation depuis plusieurs années de la vaccination, aucune étude n'a concerné l'estimation de l'impact financier de la theilériose tropicale notamment en situation d'endémie stable. L'objectif de la première partie de ce travail expérimental est d'estimer l'impact financier de la theilériose tropicale chez les veaux maintenus en situation d'endémie stable. Ce travail a également pour objectif d'estimer l'intérêt financier de la vaccination par les vaccins à base de cultures cellulaires atténués.

L'approche de vaccination par le « *prime-boost* » est une nouvelle approche d'immunisation qui permet notamment le montage d'une réponse immune spécifique de type Th1, l'apparition de cellules T cytotoxiques et la production d'anticorps. De ce fait, le « *prime-boost* » pourrait représenter une nouvelle alternative de routage d'antigènes potentiellement intéressante dans la theilériose tropicale. Plusieurs variantes de « *prime-boost* » ont été utilisées avec des résultats encourageants pour immuniser l'homme et les animaux contre des maladies virales, parasitaires ou bactériennes. Dans le présent travail, nous avons procédé à des essais cliniques de stade II pour l'immunisation de veaux contre la theilériose tropicale des antigènes de sporozoïtes, de schizontes et de mérozoïtes administrés par « *prime-boost* » hétérologue sous forme d'ADN recombinant avec des rappels par des protéines recombinantes ou par des virus recombinants.

Plusieurs antigènes de *T. annulata* ont été identifiés chez les différents stades du parasite. A ce jour, deux antigènes, un antigène de surface exprimé par

le stade sporozoïte, le SPAG-1 (Williamson et al, 1989) et un antigène de rhoptries du stade mérozoïte, le Tams, ont été testés sous forme recombinante sur veaux.

Le SPAG-1 induit *in vivo*, lors d'infection d'épreuve par des Surnageants de Broyat de Tiques Infectées (SBTI), une immunité relative qui se traduit par une diminution du taux de mortalité, une augmentation de la durée de la période pré-patente, une réduction de la parasitémie et un allongement du délai de survie des animaux (Boulter et Hall, 2000 ; Darghouth et al., Soumis pour publication). La protéine Tams détermine une immunité relative révélée par l'absence ou la réduction de cas de mortalité, et une diminution de la parasitémie et de l'intensité de l'accès fébrile (D'oliveira et al., 1997, Boulter et al., 1999). De plus, dans un de ces essais, la vaccination par des séquences d'ADN codant pour le Tams induit une immunité relative malgré l'absence de détection d'une réponse humorale spécifique (d'Oliveira et al., 1997 a et b). L'association des deux antigènes ne détermine pas d'augmentation significative de la protection contre l'infection d'épreuve à l'exception d'une réduction plus importante de la parasitémie (Boulter et al., 1999).

La protection conférée par ces antigènes exprimés par des stades extracellulaires, sporozoïtes et mérozoïtes dépendrait logiquement de la présence d'anticorps neutralisants. De plus, la présence d'une activation de cellules T CD4<sup>+</sup> a aussi été rapportée au moins pour l'antigène SPAG-1 (Boulter et al. 1999). Dans ce contexte, les essais tendant à améliorer l'efficacité de ces antigènes se sont initialement orientés vers l'utilisation de procédé de routage optimisant en premier lieu la réponse humorale (Hall et al., 2002). Cette démarche a permis d'enregistrer des résultats encourageants, mais somme toute relatifs comme l'indiquent la survie d'au plus la moitié des veaux vaccinés lors d'infection d'épreuve homologe (Boulter et Hall, 2000).

Il est actuellement admis que l'immunité contre la theilériose tropicale repose sur une réponse cellulaire de type Th1 conduisant à l'apparition de cellules T CD8<sup>+</sup> et de macrophages activés (Preston et al., 1999). Ces derniers effecteurs joueraient un rôle crucial dans l'immunité contre *T. annulata* par la phagocytose

notamment de stades parasitaires libres, la production de cytokines cytostatiques inhibant le développement du parasite dans les leucocytes et enfin la production de monoxyde d'azote qui d'une part s'est avéré toxique pour les stades schizontes et qui d'autre part s'oppose *in vitro* à l'infection des leucocytes mononuclées par les sporozoïtes (Visser et al., 1995). Par conséquent, l'utilisation de nouveaux procédés de routage capables d'induire une réponse de type Th1 associée à une production d'anticorps pourrait présenter une alternative potentielle pour améliorer l'immunité conférée par les antigènes SPAG-1 et Tams. Par ailleurs, il est plus que probable que la mise au point de vaccins sous-unitaires au moins aussi efficaces que les vaccins vivants atténués dépendra de l'association d'antigènes ciblant les différents stades du parasite. En effet, les rares essais réalisés avec cette approche, association Tams et SPAG-1 (Boulter et Hall, 1998) et vaccin atténué et SPAG-1 (Darghouth et al., Soumis pour publication) ont mis en évidence une synergie particulièrement évidente dans le dernier travail cité. De ce fait, l'orientation vers le choix d'un système de routage capable d'induire une réponse de type Th1, ainsi que la production d'anticorps serait d'autant plus justifié qu'il sera nécessaire d'inclure dans ces vaccins multi-stades des antigènes ciblant les schizontes, principal stade pathogène de *T. annulata*.

Le routage d'antigène par l'approche du « *prime-boost* » hétérologue, représente une nouvelle alternative qui a permis d'améliorer significativement l'immunité induite contre différents agents infectieux parasitaires, viraux et bactériens (Ramshaw et Ramsay, 2000). Dans cette approche la primovaccination est assurée par des séquences d'ADN codant pour l'antigène et véhiculés par un vecteur plasmidique, alors que les injections de rappel sont faites en administrant les mêmes séquences dans un vecteur différent (Woodland, 2004). Il a été établi que la stratégie de « *prime-boost* » permet d'obtenir des effets additifs qui deviennent synergiques si le rappel est effectué avec un Poxvirus ou un Adénovirus (Woodland, 2004). L'ADN a d'excellentes propriétés de « *priming* » (mais de mauvaises propriétés de « *boosting* »), par contre les virus recombinants possèdent une excellente propriété de « *boosting* » (Woodland, 2004). En effet, l'approche du « *prime-boost* » hétérologue a la particularité de conférer une solide



immunité à médiation cellulaire et humorale avec notamment l'induction d'une réponse T CD8<sup>+</sup> et l'activation des cellules T mémoires (Ramshaw et Ramsay, 2000). Une étude menée par Gilbert et al. (2002) chez des souris vaccinées contre *Plasmodium berghei* ont démontré la présence d'une activation clonale des lymphocytes B et T aussi bien CD8<sup>+</sup> que CD4<sup>+</sup>. Les virus recombinant de la vaccine ont été largement utilisés comme vecteur de rappel pour induire une réponse cellulaire et humorale contre différents agents infectieux (Paoletti, 1996). Le virus modifié Ankara de la vaccine ou MVA (« *Modified Vaccinia Virus Ankara* ») a été utilisé dans de nombreux essais du fait d'une excellente innocuité consécutive à la perte de son pouvoir replicatif chez l'hôte et de sa haute immunogénicité.

Des travaux plus récents ont montré que le rappel suivant les primovaccinations par l'ADN peut être fait par la protéine recombinante elle-même. Cette variante du « *prime-boost* » hétérologue a notamment été utilisée chez la souris avec l'antigène Map1 de *Cowdria ruminantium* (Nyika et al., 2002) et chez l'homme avec la protéine CSP de *Plasmodium falciparum* (Epstein et al., 2004). Ce protocole d'immunisation permet notamment d'induire ou d'accroître la réponse humorale et ce en présence d'une forte réponse cellulaire de type Th1 induite par l'ADN. Ces résultats sont particulièrement intéressants dans le paludisme chez l'homme car l'utilisation du « *prime-boost* » hétérologue avec rappel par des Poxvirus renforce significativement la réponse lymphocytaire T, mais reste incapable d'induire une réponse humorale.

Le présent travail a eu pour objectif d'évaluer sur des veaux l'apport du « *prime-boost* » dans la vaccination par les antigènes SPAG-1 et Tams utilisés séparément ou ensemble. Deux modalités de vaccination par « *prime-boost* » seront comparées ici, l'une avec un rappel par un virus recombinant : le MVA et la seconde par l'utilisation de protéines recombinantes.

## **-I- Matériel et méthodes**

### **-I-1- Animaux**

Un total de 20 veaux de race Frisonne - Holstein âgés entre 3 et 6 mois ont été utilisés dans cet essai, afin d'éviter la présence d'Ac colostraux dans le sérum des veaux, et pour des raisons d'homogénéité et de commodité pratique. Les veaux ont été randomisés en 5 groupes de quatre chacun, ce choix a été fait pour pouvoir effectuer des analyses statistiques selon un plan factoriel 2x2 (Laplache et al., 1987). Cette méthode d'analyse permet de diviser par deux le nombre de sujets nécessaires tout en gardant la même puissance de l'essai. Les veaux proviennent d'une ferme moderne qui est indemne de tiques et de maladies transmises par les tiques (notamment la theilériose tropicale). Avant leur inclusion dans l'essai, les veaux ont été examinés pour la recherche de tout signe clinique de maladie. L'essai a eu lieu à l'étable de l'Ecole Nationale de Médecine Vétérinaire de Sidi Thabet (Tunisie) qui est indemne de tiques. Un mois d'adaptation a été observé pour les veaux. Les veaux ont été répartis de façon aléatoire en cinq groupes de quatre veaux chacun. Quatre groupes ont été vaccinés et le cinquième a servi comme groupe témoin.

### **-I-2- Protocole de vaccination**

La primo-vaccination des animaux a été effectuée par 2 injections de séquence d'ADN codant pour l'un des deux Ag Tams et SPAG-1 séparées de 20 jours. L'ADN a été administré dans le vecteur plasmidique pSG2 à raison de 4 mg de plasmides/ veau vacciné. La dernière injection de rappel a été faite 20 jours plus tard en utilisant soit des séquences d'ADN codant pour les Ag utilisés incorporés dans la souche MVA du virus de la vaccine à raison de  $5 \cdot 10^8$  PFU/veau (Plate Forming Unit), ou 450 µg de l'Ag recombinant mélangé à l'adjuvant Montanide ISA 50 (solution minérale de Montanide Oléate, Laboratoire Seppic). Les injections d'ADN (plasmide et MVA) ont été faites par la voie intradermique.

L'ADN a été administré sous un volume de 1 ml réparti en 10 points d'injection de 0,1 ml chacun en utilisant une seringue dermojet. Ces injections ont été faites sur le côté latéral gauche de l'encolure après avoir rasé la peau afin de s'assurer de

l'absence d'infection dans les points d'injection. De plus, les points d'injections ont été examinés quotidiennement.

Les Ag recombinants SPAG-1 et Tams ont été injectés sous un volume de 2 ml dans l'adjuvant huileux Montanide ISA 50 (solution minérale de Montanide Oléate, Laboratoire Seppic). Ces Ag ont été préalablement dissous dans 1ml de PBS (Phosphate Buffered Saline, Sigma), puis mélangés à 1 ml de Montanide ISA 50 à l'aide d'une seringue jusqu'à l'obtention d'une émulsion stable.

Au total, quatre groupes d'animaux ont été vaccinés par les Ag SPAG-1 et Tams utilisés seuls ou en association comme détaillé dans le Tableau I. Afin d'éviter une interaction hypothétique, tous les antigènes utilisés dans la vaccination du groupe cocktail ont été injectés séparément. Le groupe témoin d'animaux utilisé dans cet essai, a uniquement reçu l'adjuvant dans du PBS.

**Tableau I**  
**Protocole de vaccination des veaux**

N°	Groupe de veaux	Jour 0	Jour 21	Jour 42
1	Groupe SPAG-1	ADN SPAG-1	ADN SPAG-1	SPAG-1 Rec.
2	Groupe Tams	ADN Tams	ADN Tams	Tams Rec.
3	Groupe Cocktail	ADN Tams SPAG-1	ADN Tams SPAG-1	Tams & SPAG-1 Rec.
4	Groupe Tams-MVA	ADN Tams	ADN Tams	Tams-MVA
5	Groupe Témoin	Montanide ISA 50	Montanide ISA 50	Montanide ISA 50

### **-I-3- Vecteurs de vaccins et administration des vaccins**

#### **-I-3-1- Plasmides**

Les séquences d'ADN codant pour l'Ag SPAG-1 et Tams ont été insérées dans le vecteur plasmidique pSG2 (Gilbert et al., 2002). Ce plasmide isolé de *Streptococcus ganahensis* (Wohleben et Puhler, 1998) contient un promoteur de CMV (Cytomégalovirus) et un intron viral ainsi qu'un site multiple de clonage et la séquence polA de l'hormone de croissance bovine (Schneider et al., 1998). Les gènes de *Theileria* ont été sub-clonés dans le site de clonage pour créer la construction. Un épitope CD8 de souris a été fusionné avec la partie C terminale de chaque gène de

*Theileria* suivi de l'épitope de l'Ac (PK tag, Serotec), dans l'objectif de tester la stimulation des cellules T de souris après transfection dans les cellules de mammifères.

Le plasmide pSG2 contient un marqueur de résistance à la Kanamycine qui a permis la sélection durant le clonage. Chaque construction de vecteur a été séquencée au niveau de l'insert et ce afin de vérifier d'une part que les inserts ont été placés dans la bonne orientation et d'autre part, l'absence de décalage de cadres ouverts de lecture. L'expression des antigènes de *Theileria* a été vérifiée par immunofluorescence sur des cellules Cos bovines en utilisant des Ac spécifiques de chaque protéine. De plus, l'expression des Ag en surface des cellules bovines a été vérifiée par immunofluorescence sur des cellules vivantes.

Les bactéries contenant chacune un plasmide ont été cultivées dans des fermenteurs, les plasmides ont été purifiés sur des colonnes Qiagen (Qiagen) en suivant les recommandations du fabricant, et suspendus dans du PBS apyrogène.

La construction SPAG-1 a subi une délétion des motifs d'élastine et ce afin d'éviter l'apparition de phénomènes d'auto-immunité.

### **-I-3-2- Constructions de MVA**

La souche Ankara du virus de la vaccine a été atténuée après plus de 570 passages dans des cultures, elle présente une délétion d'une partie du génome viral de 31 kb, et est incapable de ce fait d'infecter les cellules humaines ou animales (Sutter et Moss, 1992 ; Sutter et al., 1994). Le virus MVA a été cultivé sur des fibroblastes d'embryons de poulets dans du MEM (Minimum Essential Medium, Gibco) additionné de 10 p. cent de SVF. Les virus ont été transfectés par des vecteurs de transfert plasmidiques en utilisant la Lipofectine (Gibco). Le vecteur utilisé contient deux séquences virales homologues entre lesquelles il existe un site multiple de clonage flanqué par un promoteur synthétique viral fort.

### **-I-3-3- Protéines recombinantes**

Les gènes codant pour le SPAG-1 et le Tams ont été exprimés chez *E. coli* en utilisant le système d'expression QIAexpress system (vecteur pQE32). L'expression des protéines a été faite sous forme de protéines fusionnées avec un stretch de 6 résidus d'Histidine. Au départ, les gènes ont été sub-clonés dans le vecteur et les antigènes recombinants ont été séquencés au niveau des jonctions pour confirmer qu'aucun cadre de lecture ouvert n'a été inséré dans un sens inverse. L'expression des protéines recombinantes par *E. coli* a été induite par l'IPTG (Isopropyl-B-D-thiogalactopyranoside) (Boulter et al., 1998). Après centrifugation, le culot bactérien a été resuspendu dans du chlorure de guanidium selon les recommandations du fabricant.

Les protéines recombinantes ont été purifiées à partir de lysat bactérien en utilisant une colonne de Ni-NTA (Nickel-Nitrilotriacétate). Les protéines recombinantes ont été éluées en utilisant l'imidazole. Leur pureté a été vérifiée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) en conditions dénaturantes. Les fractions contenant des protéines recombinantes pures ont été dialysées et stockées à  $-70^{\circ}\text{C}$ .

### **-I-4- Infection d'épreuve**

Les veaux ont subi une infection d'épreuve au jour 64 avec une injection sous-cutanée (coté gauche de l'encolure) de 1 ml titrant 0,25 tiques équivalents du SBTI Ta3/2 de *T. annulata* (Darghouth et al., 1996 a), soit environ une dose létale 75 à 100 ( $DL_{75}$  -  $DL_{100}$ ) (Darghouth et al., résultats non publiés). Ce SBTI a été préparé au Laboratoire de Parasitologie de l'Ecole Nationale de Médecine Vétérinaire (Tunisie) à partir de tiques *Hyalomma anatolicum excavatum* infectées expérimentalement par *T. annulata*.

### **-I-5- Suivi clinique**

Les animaux ont fait l'objet d'un examen clinique trois fois par semaine après le début de l'immunisation puis quotidiennement à partir du jour d'infection

d'épreuve pour la recherche de signes de theilériose tropicale. La présence de température rectale supérieure à 39,5°C a été considérée comme un indicateur de fièvre (Blood et al., 1989). Tous les événements relatifs à l'état de santé des veaux ont été enregistrés. Des prélèvements de sang collectés sur tube EDTA ont été réalisés trois fois par semaine puis quotidiennement à partir du jour 7 jusqu'à la fin de l'essai pour l'estimation de l'hématocrite et de la parasitémie. L'hématocrite a été estimé en utilisant un automate d'hématologie (Coulter Counter T540, Coulter Electronics Inc., Florida).

Les veaux ont été contrôlés deux fois par jour (tard le soir et tôt le matin) pour déterminer le moment du décès et réaliser rapidement l'autopsie des animaux. Afin d'éviter une souffrance exagérée des animaux, chaque veau présentant une atteinte grave de l'état général (décubitus) et une anorexie de plus, que 3 jours a été euthanasié par une administration intraveineuse de 5 g de thiopental (Nesdonal®).

Le suivi clinique a été mené en utilisant les indicateurs suivants :

1. Durée de l'accès de fièvre
2. Jour de début de la fièvre
3. Jour de pic de fièvre
4. Durée de survie des animaux
5. Jour minimum de l'hématocrite
6. Valeur minimale de l'hématocrite

#### **-I-6- Suivi parasitologique**

La parasitémie et l'index schizonte ont été estimés respectivement sur des étalements de sang et de nœuds lymphatiques colorés au Giemsa. Les biopsies de nœuds lymphatiques ont été réalisées sur le nœud lymphatique préscapulaire satellite du lieu d'inoculation des SBTI.

Après coloration au Giemsa, les étalements ont été examinés sous un microscope Olympus © au grossissement x 100 à l'huile à immersion. La parasitémie a été estimée comme suit (Darghouth et al., 1996 b) :

- Si la parasitémie est inférieure à 1 p. cent (c'est à dire un érythrocyte infecté pour 100 observés), 50 champs microscopiques ont été examinés. Sinon, 20 champs sont observés.
- L'index schizonte a été estimé en examinant 300 leucocytes mononucléés si l'intensité d'infection est faible, sinon 100 cellules ont été examinées.

Le suivi parasitologique a été mené en utilisant les indicateurs suivants :

1. Jour de détection des premières formes érythrocytaires qui correspond à la période prépatente pour les formes érythrocytaires
2. Jour de parasitémie maximale
3. Maximum de piroplasmes
4. Intervalle premier jour de piroplasmes – pic de piroplasmes qui permet de quantifier la rapidité de la multiplication de la population parasitaire
5. Jour de détection des premiers schizontes qui correspond à la période prépatente pour les schizontes
6. Maximum de l'index schizonte
7. Jour de maximum de l'index schizonte
8. Intervalle premier jour de schizonte – pic de schizontes qui permet de quantifier la rapidité de la multiplication de la population parasitaire

### **-I-7- Test de transformation lymphoblastique**

La prolifération des lymphocytes des animaux vaccinés et témoins a été mesurée *in vitro* envers les deux Ag SPAG-1 et Tams, utilisés seuls ou en association. Le test de transformation lymphoblastique (TTL) a été réalisé à J0, J30, J52 et J7 post-infection d'épreuve. Cependant, pour les veaux appartenant au Groupe Témoin, le TTL a été réalisé uniquement à J52 et J7 post-infection d'épreuve. Les TTL ont été réalisés en employant le kit CellTiter 96 © Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega, référence G358A) qui est basé sur une technique colorimétrique. Brièvement, 20 ml de sang ont été prélevés stérilement dans des tubes héparinés (Vacutainer ©). Les échantillons ont été placés dans des tubes « Universal » et centrifugés à 1000 g (2900 tr/mn) pendant

20 minutes à une température de 4°C. Le manteau cellulaire blanc est transvasé dans des tubes « Universal » contenant 8 ml de PBS à pH 7,4. Après avoir été homogénéisées, les cellules ont été transvasées dans des tubes contenant 9 ml de Ficoll (Histopaque © 1077, Sigma) gardé à température de laboratoire. Les tubes ont été centrifugés à 800 g (2500 tr/mn) pendant 35 minutes et à une température de 15°C. A l'aide d'une pipette stérile, les cellules sont prélevées sous un volume maximal de 3 ml puis diluées dans des tubes « Universal » contenant 20 ml de PBS stérile et lavées par centrifugation à 350 g (1500 tr/mn) pendant 10 minutes à une température de +15°C. Les cellules sont lavées une seconde fois pendant 10 minutes, par la suite elles sont placées dans 2 à 5 ml de RPMI 1640 complet (*Rose Park Memorial Institute*) (Gibco BRL) contenant  $5 \cdot 10^{-5}$  M 2-mercapto-éthanol. Les lymphocytes du sang périphérique ainsi obtenus ont été dilués à une concentration finale de  $5 \cdot 10^6$  cellules/ml. Le test a été effectué sur des plaques de microtitration 96 puits à fond en U en plaçant 100 µl de suspension de cellules et 100 µl de chaque Ag seul, dilué à 1 µg/ml ou des deux Ag associés utilisés chacun à la concentration de 1 µg/ml du milieu de culture. Afin de réduire la variabilité des mesures, des triplets ont été utilisés pour chaque antigène et chaque veau. Pour chaque animal, des puits témoins positifs et témoins négatifs ont été inclus dans l'essai. Dans les puits témoins positifs, les cellules ont été mises en présence de 100 µl de PHA (Sigma) à la concentration de 1µg/ml, alors que dans les puits témoins négatifs elles ont été mises en présence de 100 µl de milieu de culture RPMI complet.

L'estimation de la prolifération cellulaire a été réalisée en suivant les instructions du fabricant. Un volume de 100 µl de cellules ont été mélangées dans des plaques 96 puits à fond plat, avec 20 µl du mélange Tetrazolium / MTS (CellTiter 96 © Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega, référence G358A)). Les plaques ont été incubées dans une ambiance humide à une température de 37°C et à 5 p. cent de CO<sub>2</sub> pendant 1 heure. La densité optique (DO) a été estimée avec un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 492 nm et une longueur d'onde différentielle de 630 nm. Le niveau de prolifération a été mesuré en retranchant la stimulation non spécifique obtenue dans les puits



témoins et ce en calculant la variation relative de la densité optique selon la formule suivante :

$$\text{Variation relative} = (\text{D.O. Témoin négatif} - \text{D.O. puits}) / \text{D.O. Témoin négatif}$$

Au jour 7 post-infection d'épreuve, l'absence de cellules infectées par les schizontes de *T. annulata* dans les cellules leucocytaires isolées de chaque animal, a été confirmée après coloration au Giemsa de spots obtenus après centrifugation de 30 µl de suspension cellulaire (1000 tours/minute pendant 5 minutes) dans une cyto-centrifugeuse (Cytospin®). Les lames ont été observées au microscope optique à l'objectif x 100 et à l'huile à immersion.

### **-I-8- Immunodot blot**

L'apparition d'Ac spécifiques des Ag inoculés aux animaux a été évaluée par des immunodot blots réalisés sur les sérums des veaux à J7 post-infection d'épreuve pour l'Ag SPAG-1 et Tams.

Le protocole est celui utilisé habituellement pour cette technique (Kaba et al., 2003). Brièvement, sur une membrane de nitrocellulose (Hybond-C extra, Amersham Life Science) ont été fixés 2,5 µg de Tams-1 ou 1,6 µg de SPAG-1 sous un volume de 5 µl. Après avoir été asséchée à température de laboratoire, la membrane est incubée pendant une nuit à + 4°C dans un tampon de saturation composé de 3 p. cent de lait écrémé (Régilait) et 2 p. 1000 de Tween 20 (Scharlau) dans du PBS. Le lendemain, la membrane est lavée 6 fois pendant 5 minutes dans un tampon de lavage (2 p. 1000 de Tween 20 dans du PBS). La membrane est incubée pendant 2 heures avec l'Ac primaire dilué à 1/200 ou 1/1000 dans le tampon de saturation. Les Ac non fixés sont éliminés par six incubations de la membrane sous agitation de 5 minutes chacun dans du PBS Tween 20 à 2 p. 1000. Finalement, la membrane est incubée pendant 2 heures avec un conjugué anti-bovin préparé sur lapin marqué à la peroxydase (Nordic Immunological Laboratories) et dilué à 1/1000 dans le tampon de saturation. La membrane est lavée deux fois dans le tampon de lavage et incubée avec une solution de révélation (20 mg de 3,3'-Diaminobenzidine (DAB), Sigma ; 70 µl d'eau oxygénée à 30 p. cent, Sigma dans 30 ml de tampon Tris 0,5 M). Pour arrêter la réaction, la

membrane est lavée dans de l'eau distillée. Rapidement après la révélation, la membrane est photographiée.

Deux sérums témoins positifs au Tams (animal porteur asymptomatique issu d'une étable en situation d'endémie stable à la theilériose tropicale (Gharbi et al., 2004)) et au SPAG-1 (animal immunisé avec un Ag SPAG-1 recombinant (Darghouth et al., soumis pour publication)) ainsi qu'un sérum témoin négatif ont été testés. De plus, une bande qui n'a pas été incubée avec le sérum primaire a été incluse dans l'essai pour vérifier que le conjugué ne reconnaît pas les Ag de manière non spécifique.

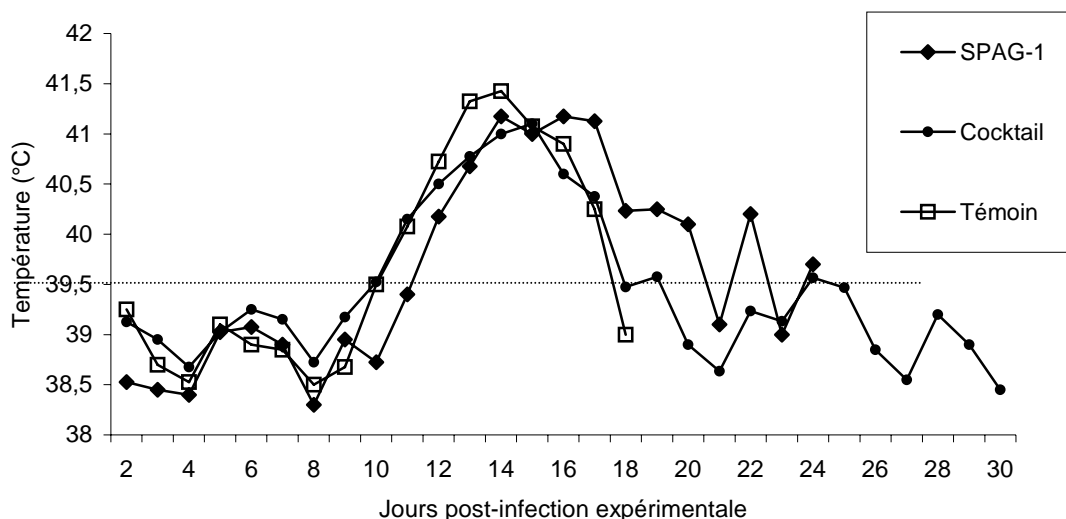
### **-I-9- Analyses statistiques**

Les comparaisons de moyennes ont été effectuées par le test U de Mann et Whitney et le test t de Student par rapport au Groupe Témoin (Schwartz, 1993). Les quatre groupes de veaux recevant le SPAG-1, le Tams, leur association ainsi que le Groupe Témoin ont été comparés en utilisant le plan factoriel 2x2 (Laplanche, 1987). Le seuil de signification est de 5 p. cent. Toutes les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel SPSS 10 © pour Windows ©.

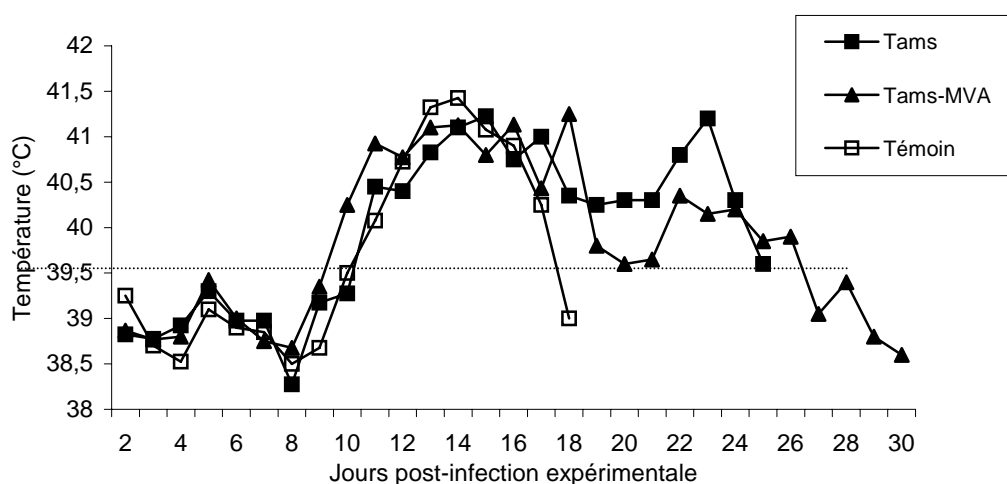
## **-II- Résultats**

### **-II-1- Suivi clinique**

Après l'infection d'épreuve, tous les veaux ont présenté un tableau clinique typique de theilériose tropicale. Au début, une hyporexie, une tachypnée et une tachycardie ont été observés, puis les animaux ont présenté des grincements de dents. De plus, une toux sèche et quinteuse due à l'inflammation a été notée chez tous les animaux. Les courbes de température ont été consignées aux Figures 1 et 2.



**Figure 1**  
**Courbe des moyennes des températures des Groupes 1 (SPAG-1), 3 (Cocktail) et 5 (Témoin)** (en lignes discontinues, valeurs seuils)



**Figure 2**  
**Courbe des moyennes des températures des Groupes 2 (Tams), 4 (Tams-MVA) et 5 (Témoin)** (en lignes discontinues, valeurs seuils)

La température moyenne des cinq groupes de veaux a présenté une légère élévation à J4 post-infection d'épreuve, la fièvre a débuté à partir de J9, J11 et a culminé vers J14. Pour les veaux survivants appartenant au Groupe Cocktail, une

normalisation de la température est enregistrée à partir de J26 post-infection d'épreuve (Figure 1).

Les indicateurs cliniques relatifs à la température dans les cinq groupes de veaux sont présentés dans le Tableau II.

**Tableau II**  
**Indicateurs de température dans les cinq groupes de veaux** (les valeurs sont données en moyenne par groupe)

Indicateur clinique	Indicateur	Groupe de veaux				
		1 (SPAG-1)	2 (Tams)	3 (Cocktail)	4 (Tams- MVA)	5 (Témoin)
<i>Durée de l'accès de fièvre (&gt;39,5)</i>	Moyenne	9 <sup>a</sup>	11,25 <sup>a</sup>	10,5 <sup>a</sup>	9,25 <sup>a</sup>	6,75 <sup>a</sup>
	Range	[6;12]	[6;18]	[7;16]	[6;15]	[5;8]
<i>Jours de début de la fièvre (&gt;39,5)</i>	Moyenne	6,5 <sup>a</sup>	7,5 <sup>a</sup>	6,25 <sup>a</sup>	7 <sup>a</sup>	6,2 <sup>a</sup>
	Range	[3;10]	[7;8]	[1;9]	[3;9]	[0;9]
<i>Jours de pic de fièvre</i>	Moyenne	14,7 <sup>a</sup>	13,5 <sup>a</sup>	14,5 <sup>a</sup>	16 <sup>b</sup>	13,2 <sup>a</sup>
	Range	[13;16]	[12;17]	[13;16]	[14;22]	[13;14]

Les groupes avec des lettres différentes indiquent la présence d'une différence statistiquement significative avec le Groupe Témoin

Les taux et les délais moyen de mortalités notés dans les différents groupes sont consignés dans le Tableau III. Tous les veaux sont morts à l'exception d'un veau appartenant au Groupe Tams, ainsi que deux appartenant au Groupe Cocktail. Ces animaux ont été gardés dans l'étable pendant trois mois après l'infection d'épreuve, ils se sont totalement rétablis. Tous les veaux morts ont été autopsiés, ils ont présenté tous des lésions typiques de theilériose tropicale, il s'agit notamment d'une anémie, d'un ictère, d'une adénite généralisée, d'un purpura hémorragique, de dégénérescence hépatique et rénales et d'ulcères de la caillette.

**Tableau III**

**Délais de survie dans les cinq groupes** (les valeurs sont données en moyenne par groupe)

Indicateur clinique	Groupe de veaux				
	1 (SPAG- 1)	2 (Tams)	3 (Cocktail)	4 (Tams- MVA)	5 (Témoin)
<i>Dates de décès</i>	17	15	20	15	15
	18	18	24	16	15
	20	25	45*	18	17
	23	45*	45*	24	18
<i>Délai moyen de survie</i>	19,5 <sup>a</sup>	25,8 <sup>a</sup>	33,5 <sup>b</sup>	18,25 <sup>a</sup>	16,25 <sup>a</sup>
<i>Range</i>	[17;23]	[15;45]	[20;45]	[15;24]	[15;18]
<i>Nombre de morts à J 30</i>	4/4	3/4	2/4	4/4	4/4

\*: veaux euthanasiés à J 90

Le délai de survie du Groupe Témoin est en moyenne le plus faible (16,25 jours). Les trois groupes vaccinés ont présenté des délais de survie notablement supérieurs à celui du Groupe Témoin, en particulier pour le Groupe Cocktail et Tams avec une différence statistiquement significative pour le dernier. Cet allongement du délais de survie semble évoluer parallèlement aux taux de survie, ce qui permet de considérer que cet indicateur reflète la présence d'une protection relative avec allongement de l'expression clinique des formes létales à la theilériose tropicale et ce malgré l'absence de différence statistiquement significative qui serait en relation avec la petitesse des effectifs.

## **-II-2- Suivi parasitologique**

Les indicateurs parasitologiques recueillis chez les cinq groupes de veaux ont été consignés dans le Tableau IV. L'évolution de la parasitémie moyenne dans les 5 groupes vaccinés et témoins a été représentés aux Figures 3 et 4.

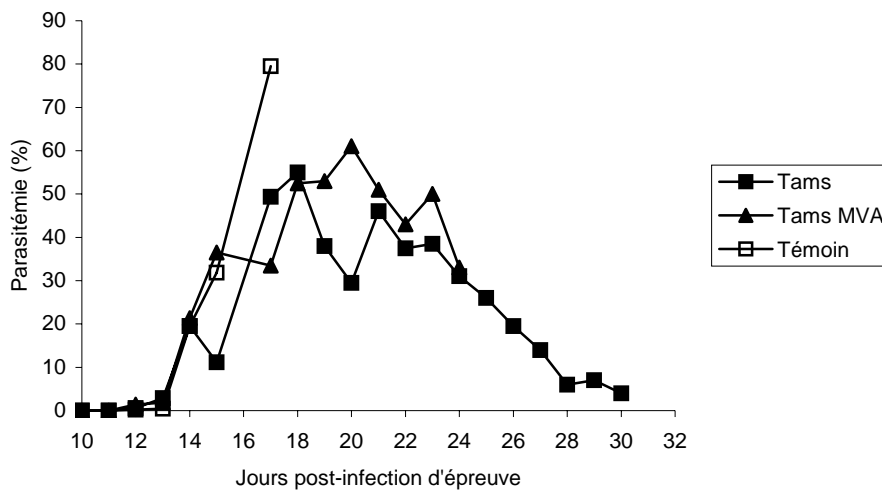
Tableau IV

**Indicateurs parasitologiques dans les étalements de sang et les biopsies des nœuds lymphatiques** (les valeurs sont données en moyenne par groupe)

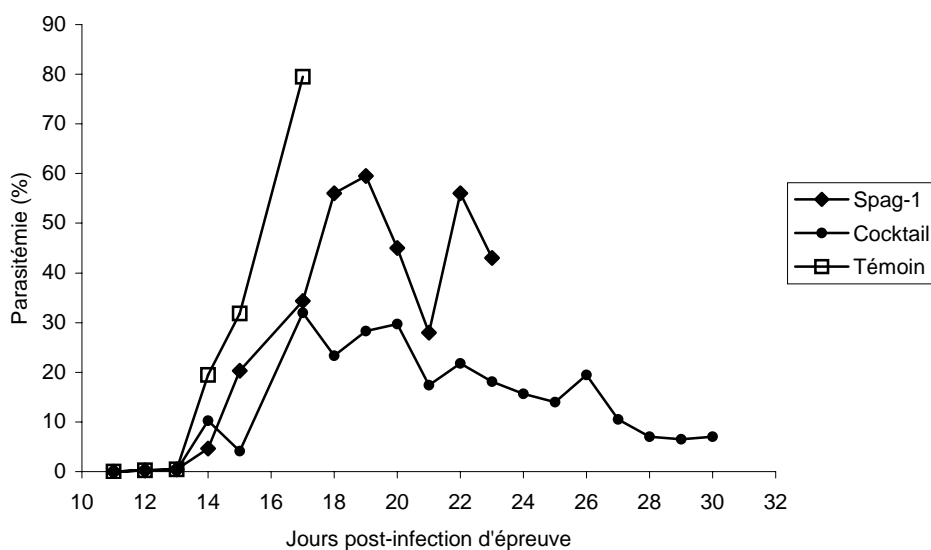
Indicateur clinique	Indicateur	Groupe de veaux				
		1 (SPAG- 1)	2 (Tams)	3 (Cocktail)	4 (Tams- MVA)	5 (Témoin)
<i>Premier jour de piroplasmés</i>	Moyenne	12 <sup>a</sup>	10,7 <sup>a</sup>	11,5 <sup>a</sup>	12,7 <sup>a</sup>	11,2 <sup>a</sup>
	Range	[11;13]	[10;11]	[10;12]	[12;14]	[10;13]
<i>Jour de parasitémie maximale</i>	Moyenne	17,5 <sup>b</sup>	17,2 <sup>b</sup>	21,2 <sup>b</sup>	16,7 <sup>a</sup>	15,7 <sup>a</sup>
	Range	[15;19]	[14;21]	[19;26]	[15;20]	[14;17]
<i>Maximum de piroplasmés (%)</i>	Moyenne	48,7 <sup>a</sup>	60,5 <sup>a</sup>	44 <sup>a</sup>	56,5 <sup>a</sup>	59,2 <sup>a</sup>
	Range	[33;6]	[42;80]	[16;71]	[35;67]	[21;94]
<i>Intervalle premier jour de piroplasmés-pic de piroplasmés</i>	Moyenne	5,5 <sup>a</sup>	6,5 <sup>b</sup>	9,7 <sup>b</sup>	4 <sup>a</sup>	4,5 <sup>a</sup>
	Range	[4;7]	[3;11]	[8;14]	[3;7]	[1;6]
<i>Jour de détection des premiers schizontes</i>	Moyenne	11 <sup>a</sup>	10,2 <sup>a</sup>	10,5 <sup>a</sup>	12,7 <sup>a</sup>	10,3 <sup>a</sup>
	Range	[10;12]	[9;14]	[8;16]	[9;18]	[9;12]
<i>Maximum de l'index schizonte (%)</i>	Moyenne	38,5 <sup>a</sup>	34,2 <sup>a</sup>	34,6 <sup>a</sup>	28,6 <sup>a</sup>	34,3 <sup>a</sup>
	Range	[26;62]	[1;59]	[3;64]	[0,67;51]	[0,25;68]
<i>Jour de d'index schizonte maximum</i>	Moyenne	16 <sup>b</sup>	15,5 <sup>b</sup>	17,5 <sup>b</sup>	16,5 <sup>a</sup>	13 <sup>a</sup>
	Range	[14;18]	[14;18]	[14;24]	[14;24]	[12;14]
<i>Intervalle premier jour de schizonte-pic de schizontes</i>	Moyenne	5 <sup>b</sup>	5,2 <sup>b</sup>	7 <sup>b</sup>	3,7 <sup>a</sup>	2,7 <sup>a</sup>
	Range	[4;6]	[4;7]	[6;8]	[0;6]	[0;4]

Chez le Groupe Témoin, la parasitémie moyenne a présenté une augmentation extrêmement rapide puisque le pic de parasitémie a été atteint en trois jours. Par contre, les veaux vaccinés ont présenté des parasitémies moyennes plus faibles que chez les témoins sans cependant que ce résultat ne soit significatif statistiquement. L'intervalle entre le jour d'apparition des premières formes érythrocytaires et le maximum de parasitémie a été significativement réduit dans les groupes Tams et Cocktail comparativement aux animaux témoins. De plus, La période prépatente pour les formes érythrocytaires a été plus tardive dans les quatre groupes vaccinés avec cependant un résultat statistiquement significatif dans le Groupe cocktail. Le jour du maximum d'index schizonte ainsi que le délai entre la période prépatente schizonte et le maximum de l'index schizonte été

significativement retardé dans les groupes SPAG-1, Tams et notamment cocktail. Les courbes de parasitémie moyenne par groupe ont été consignées aux Figures 3 et 4.



**Figure 3**  
Parasitémie moyenne dans les Groupes 2 (Tams), 4 (Tams-MVA) et 5 (Témoin)



**Figure 4**  
Parasitémie moyenne dans les Groupes 1 (SPAG-1), 3 (Cocktail) et 5 (Témoin)

### -II-3- Hématocrite

L'hématocrite a été estimé trois fois par semaine, les indicateurs relatifs à l'hématocrite ont été consignés au Tableau V. Nous notons que le jour d'hématocrite minimum a été le plus précoce dans le Groupe Témoin et le plus tardif pour le Groupe Cocktail, avec pour ce dernier une différence significative avec le Groupe Témoin.

**Tableau V**  
Indicateurs relatifs à l'hématocrite dans les cinq groupes de veaux (les valeurs sont données en moyenne)

Indicateur clinique	Indicateur	Groupe de veaux				
		1 (SPAG-1)	2 (Tams)	3 (Cocktail)	4 (Tams-MVA)	5 (Témoin)
<i>Jour de minimum d'hématocrite</i>	Moyenne	16,5 <sup>a</sup>	20,5 <sup>a</sup>	24,2 <sup>b</sup>	17 <sup>a</sup>	15,2 <sup>a</sup>
	Range	[11;22]	[14;26]	[18;28]	[14;22]	[14;18]
<i>Valeur minimale de l'hématocrite</i>	Moyenne	11,3 <sup>b</sup>	10,5 <sup>a</sup>	12,2 <sup>a</sup>	15 <sup>a</sup>	17,4 <sup>a</sup>
	Range	[7,9;16]	[7,6;16,8]	[7,8;20,2]	[8;22]	[9,5;24]

Les groupes avec des lettres différentes indiquent la présence d'une différence statistiquement significative avec le Groupe Témoin

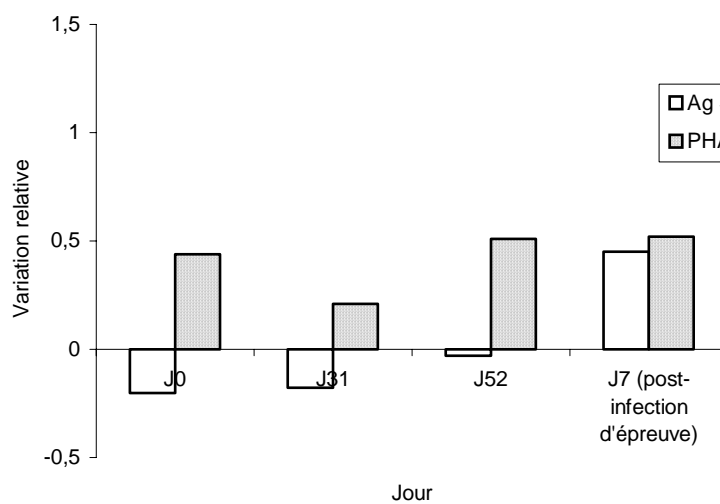
### -II-4- Test de transformation lymphoblastique (TTL)

Les TTL ont été réalisés pour tous les veaux, avec les deux antigènes SPAG-1 et Tams et un mélange des deux Ag (SPAG-1 + Tams). Les résultats obtenus dans les cinq groupes de veaux ont été représentés aux Figures 5 à 9.

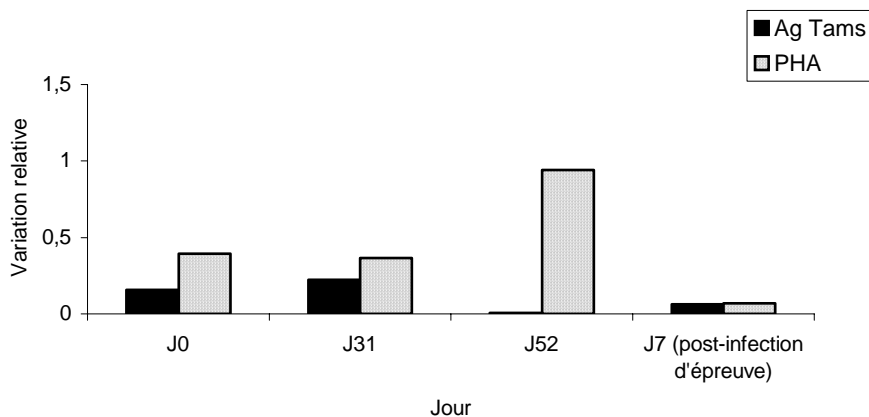




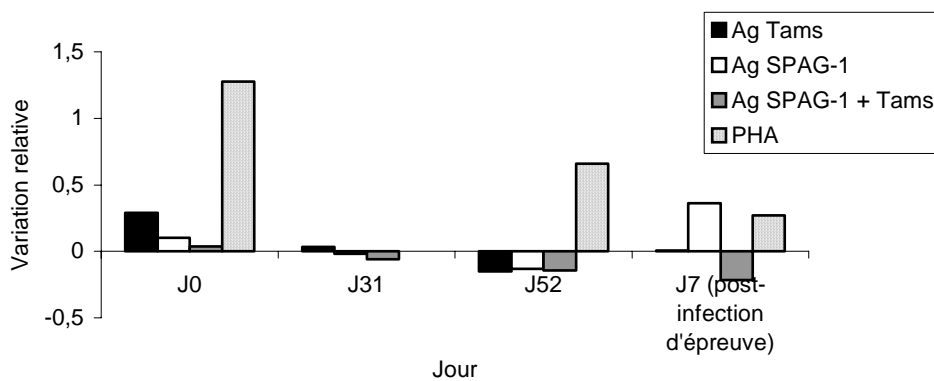
**Figure 5**  
**Résultats moyens des tests de transformation lymphoblastique du Groupe 5 (Témoin) des veaux (Jour 0 n'a pas été effectué puisque ces animaux n'ont pas reçu d'antigènes)**



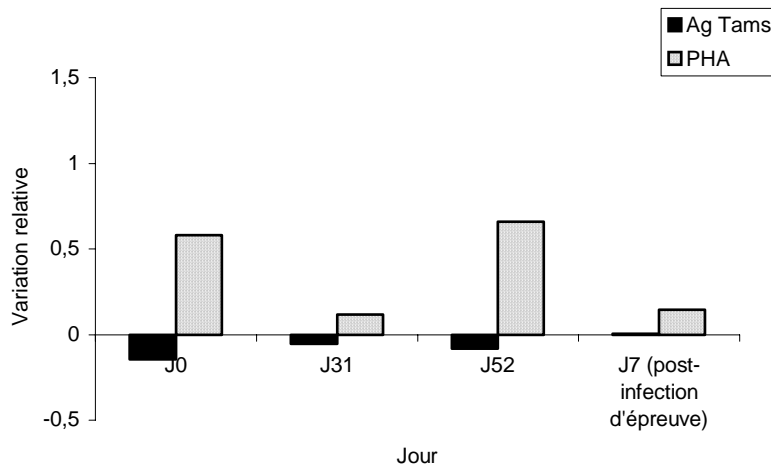
**Figure 6**  
**Résultats moyens des tests de transformation lymphoblastique du Groupe 1 (SPAG-1)**



**Figure 7**  
**Résultats moyens des tests de transformation lymphoblastique du Groupe 2 de veaux (Tams)**



**Figure 8**  
**Résultats moyens des tests de transformation lymphoblastique du Groupe 3 de veaux (Cocktail)**



**Figure 9**  
**Résultats moyens des tests de transformation lymphoblastique du Groupe 4 de veaux (Tams-MVA)**

Dans les différents groupes vaccinés, nous avons noté l'absence d'une prolifération cellulaire significative à J52 et à J7 post infection d'épreuve, à l'exception du Groupe 1 vacciné par le SPAG-1 où une activité similaire aux puits contenant de la PHA a été enregistrée à J7 post infection d'épreuve. Similairement, dans le Groupe 3 de veaux (Cocktail) un résultat comparable a été enregistré lors de la stimulation des cellules par l'Ag SPAG-1. Il convient par ailleurs de signaler que tous les groupes immunisés par l'Ag Tams ont présenté une diminution de la prolifération cellulaire lorsque des cellules sont incubées en présence de PHA.

L'examen au microscope optique des étalements de cultures cellulaires n'a pas permis la mise en évidence de schizontes au niveau des étalements provenant de tous les animaux stimulés par tous les antigènes.

#### **-II-5- Immunodot blot**

Les sérums témoins positifs ont donné une tache, alors que le sérum témoin négatif, ainsi que la bande contrôle interne sont négatifs. Les immunodot blots ont été réalisés à J7 post-infection d'épreuve aux dilutions 1/200 et 1/1000. Les résultats ont été consignés au Tableau VI.

**Tableau VI****Résultats des immunodot blots aux dilutions 1/200 et 1/1000**

Ag utilisé	Dilution de sérum	Groupe de veaux				
		1 (SPAG-1)	2 (Tams)	3 (Cocktail)	4 (Tams-MVA)	5 (Témoin)
Ag SPAG-1	1/200	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
	1/1000	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
Ag Tams	1/200	0/4	4/4	4/4	0/4	0/4
	1/1000	0/4	4/4	4/4	0/4	0/4

Seuls les veaux appartenant au Groupe 2 (Tams) et 3 (Cocktail) ont présenté des Ac anti-Tams (Tableau VI, Figure 10) aux dilutions de 1/200 et 1/1000. Il est cependant à signaler que les veaux vaccinés par les antigènes SPAG-1 et Tams recombinants ont présenté avec les 2 antigènes testés un bruit de fonds important à la dilution de 1/200. Du fait de l'absence de réactions croisées entre ces 2 antigènes et de l'absence de ce type de réactions dans le groupe Tams MVA, ce résultat est très probablement dû à la persistance d'antigènes d'*E. coli* dans les préparations antigéniques recombinantes employées pour la vaccination des veaux.



Darghouth et al. (Soumis pour publication) ont évalué l'antigène SPAG-1 envers une infection d'épreuve hétérologue létale. Les résultats obtenus ont montré que la vaccination a été suivie d'une immunité relative d'expression comparable à celle obtenue envers une infection homologue, mais d'intensité plus faible (survie d'un veau sur un groupe de 7 vaccinés).

L'antigène Tams a été utilisé dans 2 essais vaccinaux avec comme infection d'épreuve soit du sang d'animaux infectés (d'Oliveira et al., 1997 a et b) ou du SBTI homologue (Boulter et al., 1998). La vaccination a été suivie d'une immunité relative qui s'est traduite par la survie de l'ensemble et de la moitié des veaux, respectivement dans le premier et le second essai ainsi qu'une diminution de la parasitémie.

L'approche du « *prime-boost* » a été testée dans le présent travail sous deux variantes qui diffèrent par la vaccination de rappel, du MVA recombinant ou la protéine sous forme recombinante. La première variante (primo-vaccination par de l'ADN vaccinal inclus dans des plasmides vecteurs et rappel par du MVA recombinant) a donné des résultats positifs contre différents agents pathogènes comme signalé plus haut. Le choix du MVA pour l'injection d'ADN de rappel a été justifié d'une part par l'innocuité de ce virus et d'autre part par son pouvoir immunogène. Cette souche virale a été isolée à partir de lésions cutanées sur un cheval à Ankara (Turquie) et a subi 500 passages successifs sur des cellules de fibroblastes d'embryon de poulet (*chick embryo fibroblasts*) à la suite desquels elle a présenté une délétion d'un fragment d'ADN de 31 kb (Blanchard et al., 1998). Le MVA se réplique de manière très limitée, il n'exprime pas de protéines solubles qui peuvent se lier à l'IFN  $\gamma$ , à l'IFN  $\alpha/\beta$ , au TNF et au CC chemokines, néanmoins, ce virus induit la production de récepteur à l'interleukine-1 $\beta$ . Par conséquent, il a un bon pouvoir immunogène malgré son faible pouvoir réplicatif chez les mammifères. En effet, plusieurs études ont montré qu'il n'existe pas d'arguments permettant de confirmer la réplication du virus dans les lignées cellulaires humaines et animales (Drexler et al., 1998). Enfin, le MVA a été utilisé chez plus de 120.000 personnes en Allemagne et en Turquie en vue de les vacciner contre la variole avec une innocuité totale (Abaitua et al., 2005).

La deuxième variante de l'approche « *prime-boost* » appliquée dans le présent essai a consisté à utiliser la protéine recombinante pour l'injection de

rappel. Ce protocole a été suivi pour les Groupes de veaux n° 1, 2 et 3 vaccinés par le SPAG-1 et le Tams. Le « *prime-boost* » avec rappel par l'antigène sous forme protéique recombinante a été employé ici dans le but d'optimiser la réponse humorale tout en conservant l'induction de la réponse cellulaire induite par l'ADN.

Différentes voies d'administration ont été étudiées avec l'approche du « *prime-boost* », ainsi Gilbert et al. (2002) ont comparé la quantité de splénocytes (LT) synthétisant de l'IFN gamma, chez des souris immunisées par différentes voies avec l'approche de « *prime-boost* ». Ils ont montré que la voie intradermique confère la meilleure immunité suivie par la voie intramusculaire puis la voie sous-cutanée et enfin la voie intra-nasale. Par contre, l'application de l'Ag sur l'abdomen ou les oreilles des souris (« *gene painting* » ou peinture à l'antigène) ne confère aucune immunité. De même, Nyika et al. (2002) ont montré que la voie de routage de la map-1 pour immuniser des souris DBA/2 contre *Cowdria ruminantium* est capitale. Lorsque ces antigènes sont injectés incorrectement aucune immunité n'est obtenue. Chez le chien, l'approche « *prime-boost* » hétérologue a été récemment utilisée pour immuniser les animaux contre *Leishmania infantum*. En utilisant en primo-vaccination l'ADN codant pour la protéine LACK et un rappel avec le MVA recombinant injectés par la voie sous-cutanée confère une protection contre l'apparition des signes cliniques chez 4 des 5 animaux vaccinés. Par contre, les chiens immunisés avec deux injections de la protéine recombinante sans rappel avec le MVA n'ont pas présenté de protection. L'étude des PBMC (« *peripheral blood mononuclear cells*») permet de mettre en évidence la production de plusieurs cytokines : IL10 (sous unité p40), IL4, IFN $\gamma$  (Ramiro et al., 2003).

La voie intradermique a été choisie dans le présent essai de vaccination sur la base des arguments immunologiques avancés plus haut tout en tenant compte de considérations pratiques notamment lors d'utilisation potentielle de la vaccination en conditions de terrain.

Les animaux vaccinés ou témoins ont été éprouvés par l'injection d'un SBTI infecté par un stock hétérologue de *Theileria annulata* (SBTI 3) utilisé à dose létale. Le recours à une infection d'épreuve hétérologue a été choisi pour des

considérations pratiques étant donné d'une part la difficulté d'obtention de la souche homologue vis-à-vis des antigènes utilisés (souche Hissar, origine Inde), et du fait d'autre part, de l'exposition des animaux vaccinés en conditions de terrain à des infections naturelles hétérologue. En effet, le Tams et le SPAG-1 présentent un polymorphisme important et se présentent sous différentes formes alléliques, notamment en ce qui concerne le Tams (Katzner et al., 1994 ; 1998).

Les veaux appartenant au Groupe Témoin utilisés dans le présent travail n'ont reçu que l'adjuvant, étant donné que des essais antérieurs ont montré l'absence sur les veaux d'effets non spécifiques induits par le MVA et les plasmides non recombinants (résultats non montrés). Les veaux témoins ont tous été euthanasiés entre le 15<sup>ème</sup> et le 18<sup>ème</sup> jour soit à des délais comparables à ceux d'essais précédents utilisant le même SBTI. Par comparaison, dans les quatre groupes vaccinés, les délais moyens de décès ont été sensiblement augmentés soit entre 18,25 et 33,5 jours (Tableau III). De plus, le délai d'observation du pic de l'index schizonte a été nettement retardé par rapport au Groupe Témoin, de 15,5 à 17,5 contre 13 jours. Malgré l'absence, dans certains groupes, de différence statistiquement significative du fait du faible nombre d'animaux utilisés, ces résultats qui seraient à associer à l'effet de la vaccination sur les paramètres parasitologiques (Tableaux IV) indiquent globalement l'expression d'une immunité relative dans tous les groupes d'animaux vaccinés. Ainsi, ce travail montre pour la première fois avec *T. annulata*, que l'approche du « *prime-boost* » est capable d'induire une réponse protectrice avec les antigènes SPAG-1 et Tams. Il s'agit par ailleurs de la première observation de la faisabilité du « *prime-boost* » chez les bovins.

L'immunisation de veaux par le SPAG-1 recombinant en utilisant le « *prime-boost* » avec rappel par la protéine a entraîné un faible retard du délai d'apparition des premiers schizontes (11 jours *versus* 10,3 pour le Groupe Témoin,  $p > 0,05$ ), alors que le délai d'apparition du pic d'index schizonte (16 jours *versus* 13 pour le Groupe Témoin,  $p < 0,05$ ) et de parasitémie (17,5 jours *versus* 15,7 pour le Groupe Témoin,  $p < 0,05$ ) ont été nettement retardés. Ces résultats sont comparables à ceux notés antérieurement dans un essai utilisant le même antigène recombinant



et le même type d'infection d'épreuve hétérologue par le SBTI 3 (Darghouth et al., Soumis pour publication). Cette similitude indique que l'approche vaccinale utilisée ici entraîne un niveau d'immunité au moins comparable à celle générée par la protéine SPAG-1 recombinante. Une réponse significative a été notée à J7 après infection expérimentale au TTL à l'antigène SPAG-1. En effet, la prolifération cellulaire était comparable à celle des puits contenant la PHA (témoins positifs). Dans des essais antérieurs, Boulter et al. (1998) n'ont pas mis en évidence une prolifération cellulaire chez des veaux immunisés par l'Ag SPAG-1 et ce malgré la présence d'une protection relative. Cette absence de sollicitation serait due à un manque d'IL-2 exogène dans le milieu de culture (Boulter et al., 1998). Dans un autre travail avec le même antigène fusionné au core du virus de l'hépatite B (HBcAg), Boulter et al. (1995) ont mis en évidence une prolifération des cellules T des veaux immunisés. Cette prolifération serait due à la production endogène d'IL-2 par les lymphocytes T spécifiques de l'HBcAg. La prolifération notée dans cet essai indiquerait donc la libération d'IL-2 par les lymphocytes T induite par le biais du système de routage utilisé. D'ailleurs, Nyika et al. (2002) ont montré, dans un essai de vaccination contre *C. ruminantium* par l'antigène Map1 administré par « *prime-boost* » avec rappel par la protéine recombinante, que de l'IL-2 et de l'IFN- $\gamma$  sont libérés après stimulation de lymphocytes *in vitro* par le rMAP1.

La présence d'une réponse humorale a été recherchée à une semaine après l'infection d'épreuve, étant donné d'une part l'absence à cette période anticorps induits par l'infection, et du fait d'autre part d'une augmentation potentielle de la production d'anticorps sous l'effet de la mémoire antigénique probablement induite par le « *prime-boost* » comme observé avec d'autres parasites comme *P. berghei* (Gilbert et al., 2002). La technique d'immunodot blot n'a pas permis la mise en évidence de taux significatifs d'anticorps anti-SPAG-1 chez les veaux appartenant au Groupe 1 (SPAG-1) et ce même à la dilution de 1/200. Utilisé sous forme de protéine recombinante, le SPAG-1 détermine une réponse sérologique anti-SPAG-1 significative (Boulter et al., 1999 ; Darghouth et al., soumis pour publication).

Enfin, sur un plan pratique, l'observation d'une prolifération significative au SPAG-1 constitue un indicateur du succès du système de routage par « *prime-boost* » avec rappel par du rSPAG-1.

L'antigène Tams a été utilisé dans 2 essais de vaccination (d'Oliveira et al. 1997 a et b, Boulter et al., 1998) avec des taux de survie enregistrés plus importants que dans le présent travail. Cette différence pourrait s'expliquer par la nature hétérologue de l'infection d'épreuve employée ici, et ce d'autant plus qu'un polymorphisme génétique extensif a été rapporté pour le Tams (Katzner et al., 1998).

L'antigène Tams a été administré aux animaux suivant 2 procédés de routage par « *prime-boost* » qui diffèrent par la nature du rappel vaccinal, la protéine recombinante pour le Groupe 2 et du Tams MVA recombinant pour le Groupe 4. La comparaison des résultats obtenus montre que le rappel par la protéine recombinante induit une immunité relative plus solide que lors d'utilisation du Tams MVA comme l'indique notamment la survie d'un animal (Tableau III) et le délai plus long d'évolution de la maladie chez les veaux du Groupe 2 (rappel par la protéine Tams recombinante) (Tableau II). Une réponse humorale spécifique importante a été notée après rappel par le Tams recombinant, et ce même après association au SPAG-1 (Groupe Cocktail), alors qu'aucune réponse n'a pu être détectée après rappel par le Tams MVA. En effet, des taux significatifs d'anticorps anti-Tams ont été retrouvés chez tous les veaux appartenant au Groupe 2 (Tams) et 3 (Cocktail) à la dilution de 1/1000. Ces résultats sont tout à fait comparables à ceux rapportés par Epstein et al. (2004) avec l'antigène CSP de *Plasmodium falciparum* chez l'homme. Il serait tentant de rapporter la meilleure protection obtenue ici avec le Tams recombinant à une meilleure réponse humorale qui renforcerait ainsi l'immunité contre l'infection d'épreuve.

Le Tams a provoqué une suppression de la prolifération cellulaire induite par la PHA en particulier une semaine après l'infection épreuve, et ce aussi bien chez le groupe de veaux immunisés avec le Tams MVA qu'avec le Tams recombinant. Ce résultat, également observé chez les veaux appartenant au Groupe 3 (Cocktail

Tams SPAG-1), indiquerait l'induction par l'Ag Tams de mécanismes suppresseurs de l'activation non spécifique des cellules T. Ce phénomène, d'ailleurs rapporté avec l'antigène SPAG-1 par Preston et al. (2003) pourrait contribuer à l'immunité relative obtenue dans le présent travail en s'opposant au phénomène d'activation non spécifique des cellules T qui, joue un rôle important dans la pathogénie de la theilériose (Campbell et Spooner, 1999 ; Preston et al., 1999).

L'association des deux antigènes Tams et SPAG-1 en utilisant le « *prime-boost* » avec rappel par les protéines recombinantes a induit, dans cet essai, l'immunité relative la plus solide comme l'indique de prime abord la survie de deux veaux parmi les quatre vaccinés (Tableau III). Cette tendance est renforcée par l'observation dans ce groupe du retard le plus significatif des jours de pic de l'index schizonte et de parasitémie, soit respectivement 17,5 et 21,2 jours, des retards les plus significatifs observés, entre d'une part le jour de détection des premiers schizontes et le pic de l'index schizonte, et d'autre part entre le jour d'apparition des premières formes érythrocytaires et le jour du maximum de parasitémie (respectivement 7 et 9,7 jours, Tableau IV). Ces deux derniers indicateurs reflètent l'effet de l'immunité sur la rapidité et l'importance de la multiplication de la population parasitaire.

Les animaux immunisés par l'association SPAG-1 et Tams ont montré une inhibition à J7 post-infection d'épreuve de l'activation non spécifique des lymphocytes par la PHA similaire à celle notée dans les deux Groupes vaccinés par le Tams MVA ou le Tams recombinant. Cette observation indique donc que ce phénomène, noté au total sur 12 veaux, est associé à l'antigène Tams et ce, indépendamment de la stratégie vaccinale utilisée. Cette suppression, rapportée ici pour la première fois avec cet antigène, devrait cependant, faire l'objet d'investigations spécifiques étant donné le rôle que pourrait jouer le Tams comme un candidat vaccinal contre la theilériose tropicale.

Les quatre animaux du Groupe Cocktail ont développé des anticorps anti-Tams, deux de ces animaux ont présenté des dot blots plus accentués dues très certainement à une réponse sérologique plus forte. Cependant, ce sont, paradoxalement, les deux veaux qui ont présenté la réponse sérologique la moins

forte qui ont survécu à l'infection d'épreuve. Ce résultat indique donc que la présence d'une forte réponse sérologique n'est pas indispensable à l'expression de l'immunité, comme d'ailleurs rapporté dans plusieurs essais conduits avec le SPAG-1 et le Tams sous forme de protéines recombinantes (Boulter et al., 1995, 1998 ; d'Oliveira et al., 1997 a et b).

Les mécanismes immunologiques expliquant l'immunité relative observée après utilisation du « *prime-boost* » hétérologue avec les antigènes Tams et SPAG-1 restent à investiguer notamment en déterminant le profil des cytokines présentes dans les surnageants de prolifération et en analysant la structure isotypique des IgG sériques des animaux vaccinés. Cependant, l'ensemble des travaux conduits avec plusieurs agents pathogènes comme les *Plasmodium* (Ramshaw et Ramsay, 2000 ; Gilbert et al., 2002 ; Nikya et al., 2002 ; Epstein, 2004 ; Sacks et Noben-Trauth, 2002 ; Huygen, 2005) démontrent l'apparition d'une réponse de type Th1 après utilisation du « *prime-boost* » hétérologue par la protéine ou le virus recombinant. Cependant, dans le présent travail, nous avons noté un effet significatif du type de rappel hétérologue utilisé, avec une amélioration significative de la protection contre l'infection d'épreuve pour le Tams recombinant comparativement au Tams MVA. Ce résultat est très original car à notre connaissance aucun travail n'a comparé l'immunité conférée par un rappel hétérologue par virus recombinant à celui opéré par l'antigène sous forme de protéine recombinante, en particulier chez l'espèce bovine. Les essais d'amélioration de la réponse induite par l'approche « *prime-boost* » restent encore empiriques, étant donné l'état des connaissances encore rudimentaires : (i) sur les mécanismes immunitaires effecteurs lors de vaccination par le Tams et le SPAG-1, (ii) et sur ceux déterminant, dans le « *prime-boost* », le type de réponse mémoire (centrale ou effectrice), sa qualité et sa durée. En effet, d'après Woodland (2004) dans sa revue sur le « *prime-boost* », la nature de l'antigène, la voie d'administration utilisée et le nombre d'injections réalisées, influent considérablement sur le profil de la réponse immunitaire ( $CD4^+$  versus  $CD8^+$ , Th1 versus Th2 ...), sur les facteurs de co-stimulation produits et enfin sur les caractéristiques de la réponse mémoire. Ainsi, à titre d'exemple, la génération d'une réponse  $CD4^+$  et  $CD8^+$  nécessite le routage de l'antigène par des voies de

présentation et d'apprêtement distinctes comme notamment la synthèse de l'antigène localement pour l'induction d'une réponse T CD8<sup>+</sup> (Woodland, 2004).

Nyika et al. (2002) ont établi que le « *prime-boost* » hétérologue avec rappel par la protéine recombinante Map1 de *C. ruminantium* entraîne l'induction d'une réponse de type Th1 caractérisée par la production d'IFN gamma, d'IL2 et d'anticorps anti-Map1 majoritairement de type IgG2a. Cette réponse serait comparable à celle notée lors d'infection naturelle par *C. ruminantium* probablement à cause d'une présentation et d'un apprêtement de l'antigène Map1 lors de « *prime-boost* » hétérologue qui reproduisent les mécanismes observés *in vivo* lors d'infection.

La supériorité relative du « *prime-boost* » hétérologue par rappel avec le Tams recombinant pourrait s'expliquer ici par un phénomène similaire avec notamment l'induction d'une réponse de type Th1 conduisant à l'apparition d'anticorps opsonisants et de macrophages activés capables d'intervenir sur les différents stades du parasite comme l'indique notamment l'effet significatif de la vaccination anti-Tams sur certains paramètres parasitologiques se rapportant aux schizontes (Tableau IV). D'ailleurs, l'effet de synergie noté ici pour l'association SPAG-1/Tams, pourrait être dû à la potentialisation de la production de facteurs de co-stimulation par les deux réponses immunitaires anti-SPAG-1 et anti-Tams conduisant ainsi globalement à renforcer les deux réponses mémoires spécifiques avec *in fine* l'apparition d'une population plus importante de macrophages activés effecteurs.

En définitive, le présent travail montre pour la première fois la faisabilité de la vaccination anti-SPAG-1 et anti-Tams par la stratégie du « *prime-boost* » dans la theilériose tropicale. Les résultats obtenus révèlent de plus la supériorité d'un rappel hétérologue par la protéine recombinante dans le cas du Tams, et la présence d'une synergie après vaccination par l'association des deux Ag Tams/SPAG-1. Compte tenu de la taille réduite des groupes de veaux utilisés dans le présent travail, nous pensons que ces résultats prometteurs sont à valider sur un nombre plus important d'animaux. Par ailleurs l'analyse de la réponse immunitaire induite par la vaccination devra être poursuivie par la caractérisation des isotypes

d'IgG sériques spécifiques et par la détermination du profil de la réponse en cytokines obtenue après prolifération lymphocytaires.

## Références

- [1] Abaitua F., Rodriguez J.R., Garzon A., Rodriguez D., Esteban M. 2005. Improving recombinant MVA immune responses: Potentiation of the immune responses to HIV-1 with MVA and DNA vectors expressing Env and the cytokines IL-12 and FN-gamma. *Virus Res.*, 2005 (in press).
- [2] Blanchard T.J., Alcamí A., Andrea P., Smith G.L. 1998. Modified vaccinia virus Ankara undergoes limited replication in human cells and lacks several immunomodulatory proteins: implications for uses as a human vaccine. *J. Gen. Virol.*, 79 : 1159-1167.
- [3] Blood D.C., Radostitis O.M. (Eds.) 1989. *Veterinary medicine*. Baillière Tindall, London, 1502 pp.
- [4] Boulter N., Brown D., Wilkie G., Williamson S., Kirvar E., Knight P., Glass E., Campbell J., Morzaria S., Nene V., Musoke A., d'Oliveira C., Gubbels M.J., Jongejan F., Hall R. 1999. Evaluation of recombinant sporozoite antigen SPAG-1 as a vaccine candidate against *Theileria annulata* by the use of different delivery systems. *Trop. Med. Int. Health.*, 4 : A71-A77.
- [5] Boulter N., Hall R. 2000. Immunity and vaccine development in the bovine theileriosis. *Advances in Parasitol.*, 44 : 42-97.
- [6] Boulter N.R., Brown C.G.D., Kirvar F., Glass E., Campbell J., Morzaria S., Nene V., Musoke A., d'Oliveira C., Gubbels M.J., Jongejan F., Hall F.R. 1998. Different vaccine strategies used to protect against *Theileria annulata*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 849 : 234-246.
- [7] Boulter N.R., Brown C.G.D., Kirvar F., Glass E., Campbell J., Morzaria S., Nene V., Musoke A., d'Oliveira C., Gubbels M.J., Jongejan F., Hall F.R.

1998. Different vaccine strategies used to protect against *Theileria annulata*. Ann. N. Y. Acad. Sci. 849 : 234-46.
- [8] Boulter N.R., Brown C.G.D., Kirvar F., Glass E., Campbel J., Morzaria S., Nene V., Musoke A., d'Oliveira C., Gubbels M.J., Jongejan F., Hall F.R. 1998. Different vaccine strategies used to protect against *Theileria annulata*. Ann. New York Academy of Sciences. 234-246
- [9] Boulter N.R., Glass E.J., Knight L., Bell-sakyi L., Brown C.G.D., Hall R. 1995. *Theileria annulata* sporozoïte antigen fused to hepatitis B core antigen used in vaccination trial. Vaccine, 13 (13) : 1152-1160
- [10] Bouslikhane M., Kachani M., Ouhelli M. 1998. La theilériose bovine au Maroc, investigations épidémiologiques et étude de l'impact sur la productivité des élevages. Résumé de communication orale, 15 ème congrès vétérinaire maghrébin, Hammamet, Tunisie, 5 - 6 mai 1998.
- [11] Brown C.G.D. 1990. Control of tropical theileriosis (*Theileria annulata* infection) in cattle. Parasitologia, 32 : 23-31.
- [12] Campbell J.D., Spooner R.L. 1999. Macrophages behaving badly: infected cells and subversion of the immune responses to *Theileria annulata*. Parasitol. Today, 15 : 359-363.
- [13] d'Oliveira C. 1997 (a). *Theileria annulata* : recombinant vaccine development and molecular identification. Université d'Utrecht. PhD 120 pp.
- [14] d'Oliveira C., Feenstra A., Vos H., Osterhaus A.D.M.E., Sheils B.R., Cornelissen A.W.C.A., Jongejan F. 1997 (b). Induction of protective immunity to *Theileria annulata* using two major merozoite antigens presented in different delivery systems. Vaccine, 15 : 1796-1804.
- [15] Darghouth M.A., Ben Miled L., Bouattour A., Melrose T.R., Brown C.G.D., Kilani M. 1996 (a). A preliminary study of the attenuation of Tunisian schizont-infected cell lines of *Theileria annulata*. Parasitol. Res., 82 : 647-655.
- [16] Darghouth M.A., Bouattour A., Ben Miled L., Kilani M., Brown C.G.D. 1996 (b). Epidemiology of tropical theileriosis (*Theileria annulata* infection of cattle) in an endemic region of Tunisia: characterisation of endemicity states. Vet. Parasitol., 65 : 199-211.



- [17] Darghouth M.A., Bouattour A., Kilani M. 1999. Tropical theileriosis in Tunisia: epidemiology and control. *Parassitologia*, 41 (Suppl. 1) : 33-36.
- [18] Darghouth M.A., Boulter N., Gharbi M., Tait A., Hall R. Vaccination of calves with an attenuated cell line of *Theileria annulata* and the sporozoïte antigen SPAG-1 produces synergistic effect. Soumis pour publication.
- [19] Drexler I., Heller K., Wahren B., Erfle V., Sutter G. 1998. Highly attenuated modified vaccinia virus Ankara replicated baby hamster kidney cells, a potential host for virus propagation, but not in various human transformed primary cells. *J. Gen. Virol.*, 79 : 347-352.
- [20] Epstein J.E., Charoenvit Y., Kester K.E., Wang R., Newcomer R., Fitzpatrick S., Richie T.L., Tornieporth N., Heppner D.G., Ockenhouse C., Majam V., Holland C., Abot E., Ganeshan H., Berzins M., Jones T., Freyberg C.N., Ng J., Norman J., Carucci J.D., Cohen J., Hoffman S.L. 2004. Safety, tolerability, and antibody responses in humans after sequential immunization with a PfCSP DNA vaccine followed by the recombinant protein vaccine. *Vaccine*, 22, (13-14) : 1592-1603.
- [21] Gharbi M., Sassi L., Dorchies P., Darghouth M.A. 2006. Infection of calves with *Theileria annulata* in Tunisia: economic analysis and evaluation of the potential benefit of vaccination. *Accepté, Vet. Parasitol.*
- [22] Gilbert S.C., Schneider J., Hannan C.M., Hu J.T., Plebanski M., Sinden R., Hill A.V. 2002. Enhanced CD8 T cell immunogenicity and protective efficacy in a mouse malaria model using a recombinant adenoviral vaccine in heterologous prime-boost immunisation regimes. *Vaccine*, 7-8 : 1039-1045.
- [23] Hall R., Adamson R., Boulter N. 2002. Prime-boost: the way forward for recombinant vaccines against apicomplexan parasites. A *Theileria* perspective. *Parasitol. Res.*, 13 Suppl 1 : S45-S47.
- [24] Hall R., Boulter N.R., Brown C.G.D., Wilkie G., Kirvar E., Nene V., Musoke J., Glass E.J., Morzaria S.P. 2000. Reciprocal cross-protection induced by sporozoïte antigen SPAG-1 from *Theileria annulata* and p67 from *Theileria parva*. *Parasite immunol.*, 22 : 223-230.
- [25] Huygen K. 2005. Plasmid DNA vaccination. *Microbes Infect.*, 5-6 : 932-938.

- [26] Kaba S.K., Hemmes J.C., van Lent J.W.M., Vlak J.M., Nene V., Musoke A.J., van Oers M. 2003. Baculovirus surface display of *Theileria pava* p67 antigen preserves the conformation of sporozoite-neutralizing epitopes. *Protein Engineering*, 16 : 73-78.
- [27] Katzer F., Carrington M., Knight P., Williamson S., Tait A., Morrison I.W., Hall R. 1994. Polymorphism of SPAG-1, a candidate antigen for inclusion in a sub-unit vaccine against *Theileria annulata*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 67 : 1-10.
- [28] Katzer F., McKellar S., Ben Miled L., d'Oliveira C., Shiels B. 1998. Selection for antigenic diversity of Tams1, the major merozoite antigen of *Theileria annulata*. *Ann N. Y. Acad. Sci.*, 849 : 96-108.
- [29] Laplanche A., Com-Nougé C., Flamant R. 1987. Méthodes statistiques appliquées à la recherche clinique. Ed. Flammarion Médecine Sciences. Paris. 168 pp.
- [30] Paoletti E. 1996. Applications of pox virus vectors to vaccination: an update. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 21 : 11349-11353.
- [31] Pipano E., Tsur I. 1966. Experimental immunisation against *Theileria annulata* using a tissue culture vaccine. *Refuah Veterinarith*, 23 : 186-194.
- [32] Preston P.M., Hall F.R., Glass E.J., Campbell J.D.M., Darghouth M.A., Ahmed J.S., Shiels B.R., Spooner R.L., Jongejan F., Brown C.G.D. 1999. Innate and adaptative immune response cooperate to protect cattle against *Theileria annulata*. *Parasitol. Today*, 15 : 268-274.
- [33] Ramiro M.J., Zárate J.J., Hanke T., Rodriguez D., Rodriguez J.R., Esteban M., Lucientes J., Castillo J.A., Larraga V. 2003. Protection in dogs against visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* is achieved by immunization with a heterologous prime-boost regime using DNA and vaccinia recombinant vectors expressing LACK. *Vaccine*, 21 : 2474-2484.
- [34] Ramshaw I.A., Ramsay A.J. 2000. The prime-boost strategy: exciting prospects for improved vaccination. *Immunol. Today*, 4 : 163-165.
- [35] Robinson PM. 1982. *Theileriosis annulata* and its transmission-a review. *Trop. Anim. Health Prod.*, 14 : 3-12.

- [36] Sacks D., Noben-Trauth N. 2002. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nat. Rev. Immunol.*, 2 : 845-858.
- [37] Schneider J., Gilbert S.C., Blanchard T.J., Hanke T., Robson K.J., Hannan C.M., Becker M., Sinden R., Smith G.L., Hill A.V.S. 1998. Enhanced immunogenicity for CD8+ T cell induction and complete protective efficacy of malaria DNA vaccination by boosting with modified vaccinia virus Ankara. *Nature medicine*, 4 : 397-402.
- [38] Schwartz D. 1993. Méthodes statistiques à l'usage des médecins et des biologistes. 3ème édition. Flammarion Médecine Sciences Paris, 318 pp.
- [39] Sergent E., Donatien A., Parrot L., Lestoquard F. 1945. Etude des piroplasmoses bovines. Ed. Institut Pasteur d'Algérie. 816 pp.
- [40] Sutter G., Moss B. 1992. Non replicating vaccinia vector efficiently expresses recombinant genes. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, 89 : 10847-10851.
- [41] Sutter G., Wyatt L.S., Foley P.L., Bennink J.R., Moss B. 1994. A recombinant vector derived from the host range-restricted and highly attenuated MVA strain of vaccinia virus stimulates protective immunity in mice to influenza virus. *Vaccine*, 12 : 1032-40.
- [42] Tait A., Hall F.R. 1990. *Theileria annulata*: control measures, diagnosis and the potential use of subunit vaccines. *Revue Scientifique et Technique Office International des Epizooties*, 9 : 387-403.
- [43] Visser A.E., Abraham A., Bell-Sakyi L.J., Brown C.G.D., Preston M.P. 1995. Nitric oxide inhibits establishment of macro-schizont-infected cell lines and is produced by macrophages of calves undergoing bovine tropical theileriosis or East Coast Fever. *Parasite Immunol.*, 17: 91-102.
- [44] Williamson S., Tait A., Brown C.G.D., Walker A., Beck P., Shiels B.R., Fletcher J., Hall F.R. 1989. *Theileria annulata* sporozoite surface antigen expressed in *E. Coli* elicits neutralising antibody. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 86 : 4639-4643.
- [45] Wohleben W., Puhler A. 1998. The *Streptomyces ghanaensis* low copy plasmid pSG2 and its use for vector construction. *Arch. Microbiol.*, 4 : 298-304.

- [46] Woodland D.L. 2004. Jump-starting the immune system : prime-boost comes of age. *Trends Immunol.*, 2 : 98-104.

## Troisième partie expérimentale :

la vaccination de veaux par des antigènes de schizonte de *Theileria annulata* administrés sous forme d'ADN par « *prime-boost* » hétérologue ne protège pas contre une infection d'épreuve létale par *Theileria annulata*

## Introduction

L'utilisation de vaccins sous-unitaires offre plusieurs avantages : faible coût de revient, absence de risque de transmission de contaminants et leur stabilité. Cependant, en pratique, les essais conduits jusqu'à présent avec des antigènes recombinants SPAG-1 de sporozoïtes et Tams de mérozoïtes n'ont donné que des résultats limités inférieurs à la protection conférée par des vaccins vivants atténués (Boulter et al., 1995 ; d'Oliveira et al., 1996 ; d'Oliveira et al., 1997 ; Boulter et al., 1998 ; Boulter et al., 1999 ; Kaba et al., 2003 ; Musoke et al., 2005). Plus récemment des antigènes des stades schizontes de *T. annulata* ont été caractérisés et clonés, il s'agit des antigènes CL10 (Clone 10) (Katzer et al., non publiés), Tash AT (Swan et al., 2001), Tash HN (Swan et al., 2003) de *T. annulata* et PIM (Matete et al., 2004) de *T. parva*. La présence dans ces antigènes de séquences signal, permet de les considérer potentiellement comme des antigènes d'infection présentés en s'associant au complexe BoLa classe I et induisant de ce fait une réponse T cytotoxique BoLA restreinte. L'utilisation de la vaccination par ADN avec l'approche du « *prime-boost* » hétérologue permet d'induire une réponse spécifique de type cytotoxique dans plusieurs systèmes infectieux bactériens, viraux et parasitaires (Paoletti, 1996 ; Ramshaw et Ramsay, 2000 ; Woodland, 2004). Dans ce contexte, le présent travail se propose comme objectif d'évaluer l'efficacité de ces quatre antigènes dans l'immunisation de veaux contre une infection d'épreuve par *Theileria annulata* en utilisant une approche vaccinale de type « *prime-boost* ».

## **-I- Matériel et méthodes**

### **-I-1- Animaux**

Au total 18 veaux de race frisonne pie noire, issus d'un élevage indemne de tiques et de maladies transmises par les tiques ont été utilisés dans le présent essai. Tous les animaux ont été inclus dans le protocole après un examen de leurs fiches individuelles de santé (pour s'assurer qu'ils n'ont jamais présenté de maladie) et un examen clinique approfondi.

Le jour de leur recrutement, les veaux étaient tous âgés entre 3 et 6 mois et ce pour éviter la présence d'éventuels anticorps maternels (même si l'élevage est indemne de theilériose tropicale). La limite supérieure a été choisie pour des raisons pratiques. De plus, cet intervalle a été choisi pour limiter la variabilité entre les sujets.

Les veaux ont été randomisés par lots de 3 dans des logettes individuelles, une période d'adaptation d'un mois a été observée pour les veaux dans l'étable expérimentale de l'Ecole Nationale de Médecine Vétérinaire de Sidi Thabet (Tunisie) qui a bénéficié auparavant d'un vide sanitaire et d'un traitement acaricide.

### **-I-2- Protocole de vaccination**

Les veaux ont été randomisés en trois groupes de six veaux chacun, les animaux ont été vaccinés avec quatre antigènes. Le protocole de préparation des Ag a été détaillé dans le chapitre précédent.

#### **-I-2-1- pSG 2**

C'est un plasmide de conjugaison qui se réplique de manière autorépliquative par le biais du mécanisme de rolling circle (Maas et al., 1998 ; Gilbert et al., 2002). Le plasmide pSG2 est extrait à partir de *Streptomyces ghanaensis*, où il est présent en quatre copies par élément bactérien, il a une taille de 13,8 kb

(Wohleben et Puhler, 1998). Dans ce plasmide, il a été incorporé l'un des gènes des Ag suivants (inserts) : Clone 10, PIM, Tash AT3 et Ta Sh HN selon le schéma indiqué dans la Figure 1. Chaque construction a été préparée seule.

### **-I-2-2- Antigène Tash AT**

C'est une famille de protéines qui sont codées par le gène *Tash AT* (pour « *Theileria annulata Hook AT* ») comportant des motifs adénine et thymine. Elle comporte trois protéines (Tash AT1, Tash AT2 et Tash AT3), exprimées par toutes les souches de *T. annulata*. Tash AT2 et Tash AT3 possèdent des séquences signal pour le noyau des leucocytes de l'hôte qui leur permettent d'être transportées vers le compartiment nucléaire des cellules de l'hôte vertébré. Ceci suggère fortement l'intervention de Tash AT dans l'induction de la prolifération cellulaire (Swan et al., 2001).

### **-I-2-3- Antigène Tash HN**

C'est un antigène qui fait partie de la famille de protéines Tash AT. Cette protéine est composée de 332 acides aminés et 33,8 kDa de poids. Ce sont des protéines qui sont exprimées au niveau du sporozoïte (Swan et al., 2003). Les protéines Tash HN se présentent sous trois formes dont l'une a été retrouvée au niveau du noyau des cellules de l'hôte vertébré (Swan et al., 2003).

A notre connaissance, aucune étude relative au pouvoir immunogène de Tash AT et Tash HN n'a été publiée.

### **-I-2-4- Antigène PIM (*Polymorphic Immunodominant Protein*)**

C'est un antigène polymorphe dont le poids moléculaire varie entre 70 et 90 kDa et qui est exprimé par les schizontes et les sporozoïtes de *T. parva* (Matete et al., 2004). Le gène *pim* codant pour cette protéine comporte une partie centrale

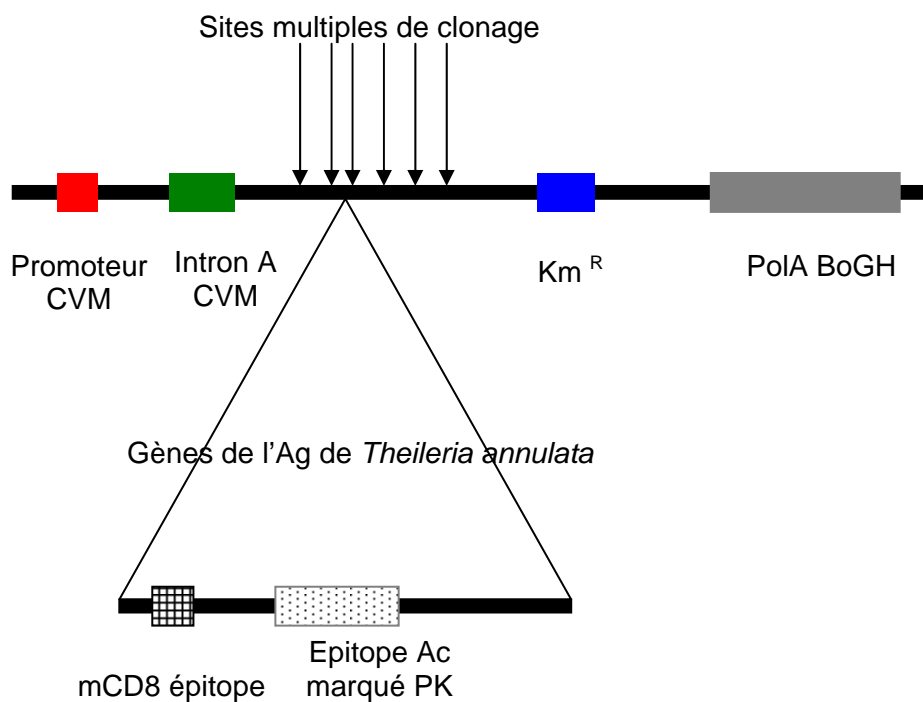


conservée flanquée en 5' et 3' par des séquences hypervariables. Alors que les séquences introniques sont conservées, les séquences exoniques sont très variables. Cette disparité est en faveur d'une forte pression de sélection qui serait due à la pression immunitaire de l'hôte (Geysen et al., 2004). D'après Geysen et al. (1999), ce polymorphisme serait dû à l'introduction, depuis plusieurs années, de vaccin trivalent contre la fièvre de la côte orientale (le cocktail Muguga) dans les zones étudiées. Toutes les protéines PIM comportent 10 épitopes qui interviennent dans l'immunité anti-*T. parva* (Toye et al., 1996).

L'Ag PIM est par conséquent un bon candidat vaccinal pour le développement de vaccins sous-unitaires pour protéger les animaux contre *T. parva* (Schnittger et al., 2002). L'existence d'une grande homologie de 93 p. cent entre l'Ag PIM et une autre protéine exprimée par *T. annulata* à savoir le TaSP (*Theileria annulata surface protein*) (Schnittger et al., 2002 ; Gilbert et al., 2005) a justifié l'inclusion de l'antigène PIM dans le présent essai de vaccination.

#### **-I-2-5- Antigène CLONE 10**

Cette protéine est exprimée par les macroschizontes et elle est reconnue par des antisérums bovins (Katzner et al., résultats non publiés). L'étude de la cinétique d'expression de l'ARN m de CL10 montre que son taux diminue entre J0 et J2, demeure constant entre J2 et J4 puis diminue entre J4 et J6 post-infection d'épreuve (Katzner et al., résultats non publiés). Lors d'infection expérimentale par *T. annulata*, les anticorps anti-CL10 sont détectables par ELISA à partir du 3<sup>ème</sup> mois après infection (Karacenc, 2002).



- Promoteur eucaryote (Cytomegalovirus)
- Intron de Cytomegalovirus
- Séquence de l'hormone de croissance bovine
- Marqueur, gène de résistance à la Kanamycine
- Epitope CD8 murin
- Epitope Ac marqué à la Phospho-kinase

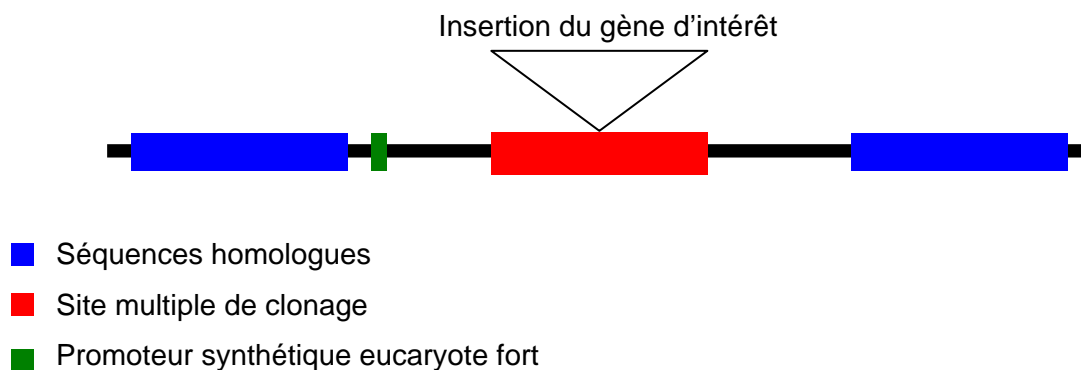
**Figure 1**  
**Structure génomique du vecteur pSG2 utilisé**

### **-I-2-6- MVA avec insert**

Le vecteur utilisé est le virus *Modified Vaccinia Virus Ankara* auquel ont été intégrés des gènes d'intérêts (un gène par construction). Le MVA est une souche mutante du virus de la vaccine qui présente une délétion au niveau du génome viral d'une portion de 31 kb. La délétion a été obtenue après plus de 570 passages successifs sur milieu de culture (Blanchard et al., 1998). Le MVA est non pathogène pour l'homme et les animaux puisqu'il a été utilisé pour vacciner 120.000 personnes contre la variole en Allemagne et en Turquie sans pour autant que les sujets vaccinés ne manifestent d'effets secondaires (Drexler et al., 1998).

La recombinaison des particules virales avec les vecteurs plasmidiques de transfert est obtenue en les cultivant sur des fibroblastes d'embryons de poulet (FEP). Les FEP infectés sont cultivés sur milieu MEM à 10 p. cent de SVF et transfectées en utilisant la lipofectine (Gibco). L'identification de plaques de virus recombinants est réalisée par l'utilisation d'Ac spécifiques des antigènes. Quand les plaques recombinantes sont identifiées, elles sont repiquées plusieurs fois pour obtenir des cultures pures.

Ainsi, au génome du virus MVA se trouve incorporé différents antigènes à savoir : Clone 10, PIM, Tash AT 3 et Tash HN. La structure finale du virus est représentée sur la Figure 2.



**Figure 2**  
**Schéma du plasmide ayant servi à la construction du MVA recombinant**

### **-I-2-7- Vecteurs de vaccination et administration des vaccins**

Les veaux utilisés dans l'essai ont été répartis en 3 groupes de 6 animaux :

**Groupe 1** : il comporte six veaux vaccinés, ces derniers ont reçu deux injections de primo-vaccination par 2 mg des plasmides pSG2 recombinants par antigène et une injection de rappel par  $5 \cdot 10^8$  pfu<sup>1</sup> du virus MVA recombinant (*Modified Vaccinia Virus Ankara*) soit environ  $12,5 \cdot 10^9$  particules virales. Les différentes injections ont été réalisées dans du TBS (Tampon tris borate salé) sous un volume de 1 ml par injection et par antigène et à intervalle de trois semaines.

**Groupe 2** : ce groupe a uniquement reçu les vecteurs non recombinants soit, deux injections des vecteurs plasmidiques pSG2 puis une injection de MVA.

**Groupe 3** : c'est un groupe témoin qui n'a reçu que l'excipient utilisé pour la préparation des antigènes.

<sup>1</sup> Un pfu (*plaque-forming units*) du virus MVA correspond à approximativement 25 particules virales (Moss et Earl, 2002).

Le protocole vaccinal a été résumé au Tableau I.

**Tableau I**  
**Protocole de vaccination des veaux**

N°	Groupe de veaux	Jour 0	Jour 21	Jour 42
1	Groupe vacciné	4mg d'ADN d'Ag dans pSG2	4mg d'ADN d'Ag dans pSG2	5. 10 <sup>8</sup> pfu de MVA recombinant
2	Groupe pSG2	4mg de pSG2	4mg de pSG2	5. 10 <sup>8</sup> pfu de MVA
3	Groupe Témoin	Aucune injection	Aucune injection	Aucune injection

Chaque injection a été effectuée de façon aseptique par la voie intradermique avec un dermojet. Afin de s'assurer que toute la dose vaccinale soit déposée au niveau du derme, nous avons injecté 0,1 ml par point d'injection en prenant le soin de provoquer la formation d'une bulle visible au niveau du derme et qui contient l'antigène.

Afin d'éviter d'éventuelles interactions entre excipients de différents Ag, un seul antigène a été injecté par seringue. Les points d'injection ont été surveillés pendant une semaine pour la survenue d'éventuelles réactions locales.

### **-I-3- Infection d'épreuve**

Les veaux ont subi une infection d'épreuve au jour 64 avec une injection sous-cutanée au niveau du côté gauche de l'encolure de 1 ml titrant 0,25 tiques équivalents du SBTI Ta3/2 de *T. annulata* (Darghouth et al., 1996), soit environ une dose létale 75 à 100 p. cent (DL<sub>75</sub> - DL<sub>100</sub>) (Darghouth et al., résultats non publiés). Le SBTI a été préparé au Laboratoire de Parasitologie de l'École Nationale de Médecine Vétérinaire (Tunisie) à partir de tiques *Hyalomma anatolicum excavatum* infectées expérimentalement par *T. annulata*.

#### **-I-4- Suivi clinique**

Le suivi clinique des veaux a été effectué deux fois par semaine avant le début de la première injection du vaccin, puis les animaux ont été examinés trois fois par semaine jusqu'à l'infection expérimentale. A partir de cette date, les animaux ont été examinés deux fois par jour jusqu'à la fin de l'essai.

A partir du jour de l'infection expérimentale, la prise de la température a été quotidienne et ce jusqu'à la mort des veaux. L'hématocrite est un bon indicateur clinique et parasitologique. En effet, lors d'infection par *T. annulata*, une hémolyse a lieu et elle est due à l'action mécanique des gamétocytes qui se localisent dans le stroma des érythrocytes. Des phénomènes auto-immuns ont été également impliqués dans la genèse de l'hémolyse (Pipano et Shkap, 2004). La détermination de l'hématocrite a été effectuée trois fois par semaine en utilisant un automate d'hématologie (Coulter Counter T540, Coulter Electronics Inc., Florida).

Les animaux présentant un tableau clinique grave caractérisé par un décubitus de plus de 3 jours, la présence de posture d'auto-consultation et une anorexie ont été euthanasiés par une injection intraveineuse de 5 g de thiopental (Nesdonal ®).

Les indicateurs cliniques suivants ont été utilisés pour comparer les résultats obtenus dans les 3 groupes :

1. Durée de l'accès de fièvre
2. Jour de début de la fièvre
3. Jour de pic de fièvre
4. Durée de survie des animaux
5. Jour minimum de l'hématocrite
6. Variation relative de l'hématocrite : différence relative entre la moyenne des 3 premières mesures de l'hématocrite et la valeur la plus basse au cours de l'essai.

7. Durée de participation de chaque individu dans l'essai depuis le jour de l'infection d'épreuve.

### **-I-5- Suivi parasitologique**

La parasitémie a été estimée sur des étalements de sang colorés au Giemsa réalisés sur des prélèvements de sang jugulaire collecté sur tube contenant de l'EDTA. La recherche des schizontes infectant des macrophages est réalisée sur des étalements de nœuds lymphatiques colorés au Giemsa et préparés à partir de ponction de nœuds lymphatiques préscapulaires satellites du lieu d'injection du SBTI (Darghouth et al., 1996).

Les prélèvements ont été effectués 3 fois par semaine à partir du jour de l'infection d'épreuve jusqu'à l'apparition des symptômes, puis quotidiennement jusqu'à la fin de l'essai.

Les étalements colorés au Giemsa sont examinés au microscope optique Olympus © au grossissement x 100 à l'huile à immersion.

- Si la parasitémie est inférieure à 1 p. cent (c'est à dire un érythrocyte infecté pour 100 observés), 50 champs microscopiques ont été examinés. Sinon, 20 champs sont observés.

- L'index schizonte a été estimé en examinant 300 leucocytes mononucléés si l'intensité d'infection est faible, sinon 100 cellules ont été examinées.

Nous avons utilisé les indicateurs parasitologiques suivant pour analyser la présence de différences entre les trois groupes expérimentaux :

1. Jour d'observation des premières formes érythrocytaires et des premiers schizontes.
2. Pic de l'index schizonte (parasitisme des nœuds lymphatiques par les schizontes) et de parasitémie sanguine.
3. Délais entre le jour d'apparition des premières formes parasitaires et le jour de pic de l'index schizonte et de parasitémie. Cet indicateur a été employé pour traduire la rapidité de la croissance de la population parasitaire chez l'hôte.

### **-I-6- Sérologie par Immunofluorescence indirecte**

Afin de rechercher la présence d'anticorps anti-schizontes de *Theileria annulata*, le test d'IFI a été effectué en utilisant l'antigène schizonte de *T. annulata*, (souche Jedaida 4). Trois dilutions ont été effectuées : 1/40, 1/80 et 1/160. La recherche des anticorps a été réalisée à J0 (avant toute injection d'antigène), ainsi qu'à J7 et J14 post-infection d'épreuve.

### **-I-7- Test de transformation lymphoblastique**

L'extraction des leucocytes a été réalisée à partir de sang total selon le protocole de Brown (1983). Vingt millilitres de sang sont prélevés stérilement sur tube hépariné. Les tubes sont identifiés et ils sont rapidement acheminés au laboratoire où ils sont transvasés dans des tubes « Universal » de 25 ml de volume et centrifugés à 1000 g (2900 tours/minute) pendant 20 minutes à +4°C.

Le manteau cellulaire est prélevé et placé dans 8 ml de Tampon Phosphate Salé : PBS (*Phosphate Buffered Saline*) stérile ayant un pH = 7,4. Les cellules sont bien mélangées et elles sont coulées très doucement dans un tube contenant 9 ml de Ficoll : Histopaque © 1077 (Sigma) qu'on a laissé équilibré à température ambiante.

Les tubes sont centrifugés à 800 g (soit 2500 tours/minute) à 15 °C pendant 35 minutes. Il se forme alors trois couches (Annexe 1). Une pipette est introduite dans la couche contenant les cellules et le manteau cellulaire est prélevé sous un volume approximatif de 3 ml.

Les cellules sont ensuite placées dans un tube contenant 20 ml de PBS stérile et elles sont lavées à 350 g (1500 tr/mn) pendant 10 minutes à +15°C. Elles sont lavées une deuxième fois pendant 5 minutes. Le culot est rapidement



suspendu dans 2 à 5 ml de RPMI 1640 (*Rose Park Memorial Institute*) (Gibco BRL) maintenu à température ambiante. La concentration de cellules est ajustée à  $5.10^6$  cellules/ml avec du RPMI 1640 (Gibco BRL) stérile (Annexe 2).

Une plaque 96 puits est utilisée pour la culture des cellules. Chaque puits est rempli de 100 µl de cellules et de 100 µl de l'Ag en question. Afin de diminuer la variabilité pour chaque animal et pour chaque antigène, nous avons préparé des triplets.

Pour s'assurer de la qualité de la prolifération cellulaire, nous avons mis en place pour chaque animal, des témoins positifs et des témoins négatifs. Les puits témoins négatifs contiennent 100 µl de cellules et 100 µl de RPMI 1640. Les puits témoins positifs contiennent 100 µl de cellules et 100 µl de phytohémagglutinine (Sigma) (PHA) à la concentration de 1 µg/ml.

Au total, pour chaque animal nous avons procédé à la mise en place de 18 puits (Annexe 3). Les plaques sont incubées pendant 5 jours dans une étuve à 37 °C et 5 p. cent de dioxyde de carbone. La prolifération cellulaire a été effectuée à J0, J31 et J52 après la primo-vaccination et J7 post-infection d'épreuve. Le choix de ces dates est motivé par les faits suivants : le TTL à J0 sert comme ligne de base, il permet d'évaluer le comportement des systèmes cellulaires en absence de toute sollicitation antigénique spécifique. Les trois autres tests de transformation lymphoblastiques ont été réalisés 10 jours après chaque immunisation dans le but de vérifier si l'immunisation a induit une réponse détectable.

Après la phase d'incubation de 5 jours, la prolifération cellulaire a été mesurée en utilisant le kit CellTiter 96 © One solution (Promega) basé sur une technique colorimétrique. Ce test comporte un composé Tetrazolium : [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(2-sulfophenyl)-2H-Tetrazolium] et un réactif couplant (Phenazine ethosulfate ou PES). Le PES augmente la stabilité chimique du composé Tetrazolium pour former une solution stable. Le Tetrazolium MTS est réduit par les cellules en formazan coloré qui est

soluble dans le milieu de culture. Cette conversion a lieu par le NADPH (Nicotineamide Adénine Dinucléotide Phosphate) ou le NADH (Nicotineamide Adénine Dinucléotide, forme réduite) produits par les deshydrogénases dans les cellules métaboliquement actives. La quantité de Formazan produite est mesurée à une longueur d'onde de 490 nm et une longueur d'onde différentielle de 630 nm, elle est proportionnelle au nombre de cellules vivantes. Les résultats sont exprimés en moyenne de triplets de Densité Optique (DO).

Pour chaque puits, 100 µl de culture sont prélevés et transféré dans une plaque pour lecteur ELISA à 96 puits à fond plat. Dans chaque puits, 20 µl de CellTiter 96 © One solution (Promega) ont été ajoutés. Les plaques sont incubées pendant 1 heure à 37°C à 5 p. cent de CO<sub>2</sub> puis la D.O est mesurée pour chaque puits. Les résultats sont exprimés en calculant pour chaque test la moyenne des triplets.

A cause de la prolifération cellulaire non spécifique observée en l'absence de tout Ag et de la PHA, la variation relative a été calculée pour chaque test selon la formule ci-dessous indiquée :

$$\text{Variation relative} = (D.O. \text{ témoin négatif} - D.O. \text{ puits}) / D.O. \text{ témoin négatif}$$

### **-I-8- Analyses statistiques**

La comparaison des résultats obtenus chez les 3 groupes de veaux a été faite en deux étapes :

- (i) Le test d'homoscédasticité de Lévené pour l'homogénéité de variance (Schwartz et al., 1981). Si les variances sont homogènes, l'analyse de variance a été utilisée pour la comparaison de moyennes. Lorsque les variances ne sont pas égales, le test non paramétrique de Kruskal et Wallis a été utilisé (Schwartz, 1993).
- (ii) Si le test de comparaison de moyenne est significatif, la différence est repérée par le test de Tukey qui permet de comparer plusieurs moyennes à une seule (celle du groupe témoin) sans pour autant que cela ne provoque une inflation du risque de première espèce (risque  $\alpha$ ) (Schwartz et al., 1981).

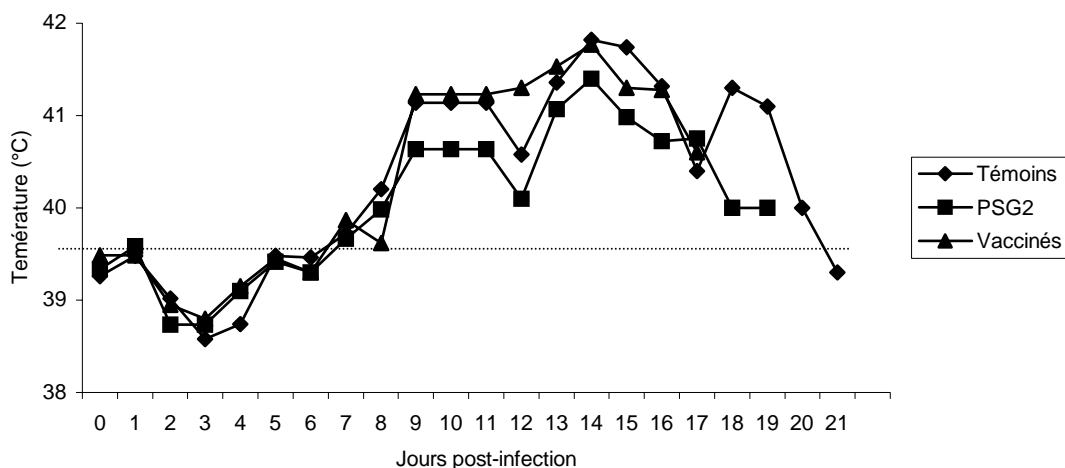
Toutes les analyses ont été faites avec le logiciel d'analyse statistique SPSS 10 © pour Windows ©.

## -II- Résultats

### -II-1- Suivi clinique

Au total, 18 veaux ont été suivis, un des veaux appartenant au groupe témoin a été éliminé de l'essai un mois avant l'infection expérimentale suite à un problème pathologique chronique.

Après infection d'épreuve, tous les animaux ont présenté un tableau clinique typique de theilériose tropicale aiguë. A partir de J7, une augmentation de la température centrale a été notée chez tous les animaux. L'étude des courbes de température permet de mettre en évidence une évolution bi-modale, avec un premier pic de fièvre vers J10, et un deuxième vers J15. Néanmoins, il n'existe pas de différence significative entre les trois groupes de veaux (Figure 3). Les différents indicateurs cliniques en rapport avec le syndrome fébrile sont regroupés dans le Tableau II, leur comparaison ne montre pas de différences statistiques significatives entre les 3 groupes de veaux.



**Figure 3**  
**Evolution des courbes des températures moyennes dans les trois groupes de veaux**

**Tableau II**  
**Indicateurs de température dans les trois groupes de veaux** (les valeurs sont données en moyenne par groupe)

Indicateur clinique	Indicateur	Groupe de veaux		
		1 (Vaccinés)	2 (pSG2)	3 (Témoin)
<i>Durée de l'accès de fièvre (&gt;39,5)</i>	<i>Moyenne</i>	7 <sup>a</sup>	6,7 <sup>a</sup>	9 <sup>a</sup>
	<i>Range</i>	[1 ;10]	[4 ;11]	[8 ;11]
<i>Jours de début de la fièvre (&gt;39,5)</i>	<i>Moyenne</i>	8,5 <sup>a</sup>	9,3 <sup>a</sup>	8,4 <sup>a</sup>
	<i>Range</i>	[7 ;13]	[8 ;9]	[8 ;9]
<i>Pic de fièvre</i>	<i>Moyenne</i>	41,2 <sup>a</sup>	41,3 <sup>a</sup>	41,5 <sup>a</sup>
	<i>Range</i>	[40,3 ;41,5]	[41 ;41,8]	[41,1 ;41,8]
<i>Jours pour atteindre le pic</i>	<i>Moyenne</i>	9,2 <sup>a</sup>	8,7 <sup>a</sup>	8,6 <sup>a</sup>
	<i>Range</i>	[7 ;13]	[8 ;9]	[8 ;9]
<i>Intervalle premier jour de fièvre-pic de fièvre</i>	<i>Moyenne</i>	4,8 <sup>a</sup>	5 <sup>a</sup>	6,2 <sup>a</sup>
	<i>Range</i>	[0 ;9]	[1 ;7]	[5,7]
<i>Jours de pic de fièvre</i>	<i>Moyenne</i>	14 <sup>a</sup>	13,7 <sup>a</sup>	14,8 <sup>a</sup>
	<i>Range</i>	[12 ;16]	[9 ;16]	[14 ;16]

Les groupes avec des lettres différentes indiquent la présence d'une différence statistiquement significative en analyse de variance. La différence avec le Groupe Témoin est recherchée par le test de Tukey.

## **-II-2- Mortalité**

Dans les trois groupes expérimentaux, l'ensemble des veaux ont succombé entre le 15<sup>ème</sup> et le 23<sup>ème</sup> jour après infection d'épreuve (Tableau III). Les délais individuels de survie après infection d'épreuve sont consignés dans le Tableau III. La comparaison de ces délais de survie ne montre pas de différences significatives entre les trois groupes de veaux.

**Tableau III**  
**Délais de survie dans les trois groupes** (les valeurs sont données en moyenne par groupe)

Indicateur clinique	Groupe de veaux		
	1 (Vaccinés)	2 (pSG2)	3 (Témoin)
<i>Dates de décès</i>	16	15	23
	16	19	17
	17	15	17
	16	18	17
	16	16	16
	16	16	
<i>Délai moyen de survie</i>	16,2 <sup>a</sup>	16,5 <sup>a</sup>	18 <sup>a</sup>
<i>Range</i>	[16;17]	[15 ;19]	[16 ;23]
<i>Nombre de morts à J 30</i>	6/6	6/6	5/5

Les groupes avec des lettres différentes indiquent la présence d'une différence statistiquement significative en analyse de variance. La différence avec le Groupe Témoin est recherchée par le test de Tukey.

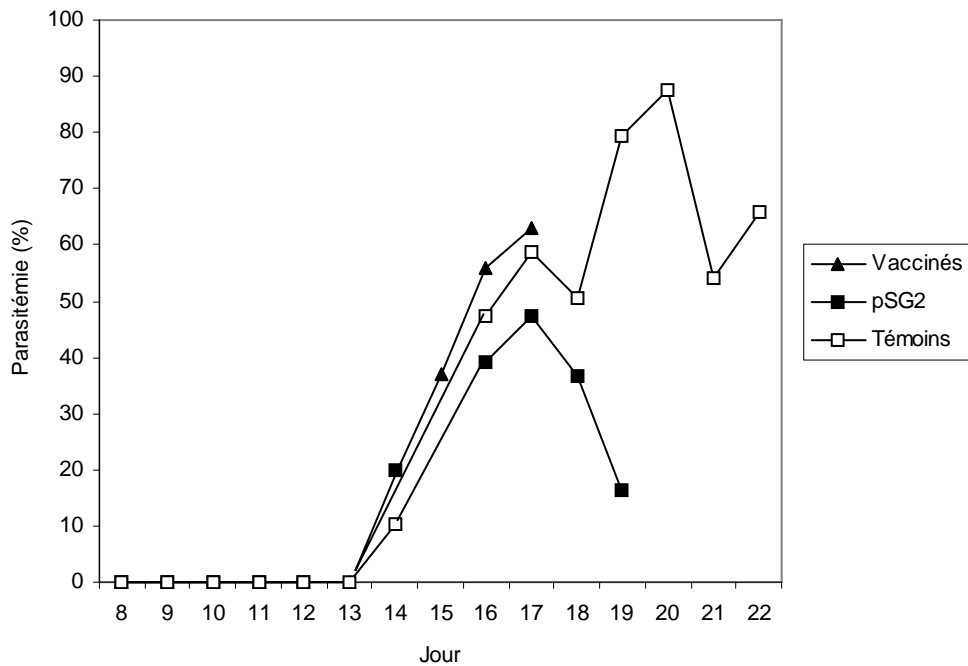
### **-II-3- Suivi parasitologique**

Les résultats du suivi parasitologique en fonction des groupes ont été consignés au Tableau IV.

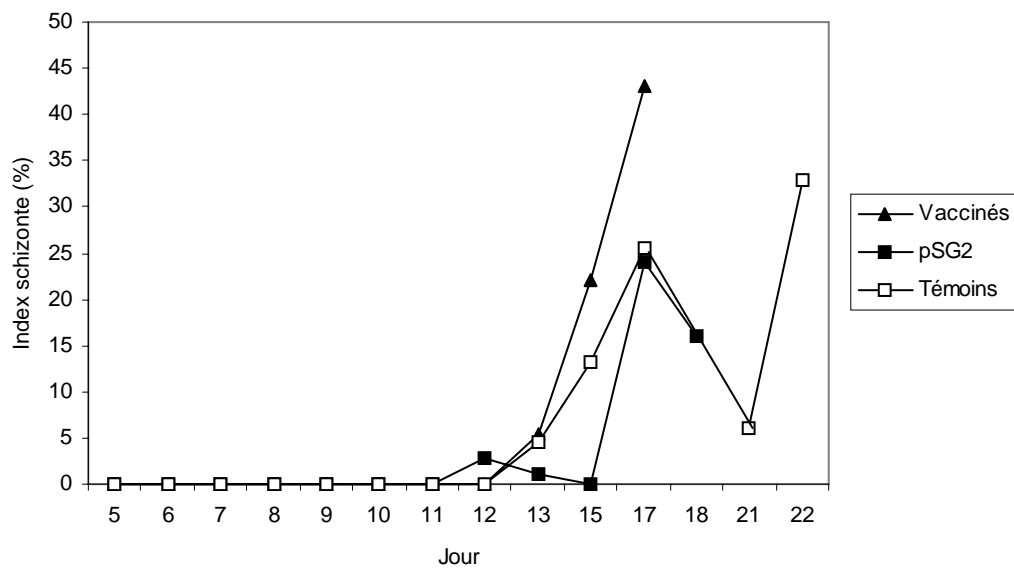
**Tableau IV**  
**Indicateurs parasitologiques dans les étalements de sang et les biopsies des nœuds lymphatiques** (les valeurs sont données en moyenne par groupe)

Indicateur clinique	Indicateur	Groupe de veaux		
		1 (Vaccinés)	2 (pSG2)	3 (Témoin)
<i>Premier jour de piroplasmes</i>	Moyenne	12,17	11,67	12
	Range	[12 ;13]	[10 ;12]	[12 ;12]
<i>Jour de parasitémie maximale</i>	Moyenne	15,8	15,8	17,4
	Range	[15 ;17]	[14 ;18]	[16 ;20]
<i>Maximum de piroplasmes (%)</i>	Moyenne	52,5	40,1	69,3
	Range	[30,5 ;70]	[15 ;77]	[55,2 ;87,5]
<i>Intervalle premier jour de piroplasmes-pic de piroplasmes</i>	Moyenne	3,7	4,2	5,4
	Range	[3 ;4]	[2 ;6]	[4 ;8]
<i>Jour de détection des premiers schizontes</i>	Moyenne	12,5	10,7	10,8
	Range	[11 ;13]	[7 ;13]	[6 ;15]
<i>Maximum de l'index schizonte (%)</i>	Moyenne	21	9,85	18,4
	Range	[0,01 ;63]	[0,02 ;32]	[0,02 ;33]
<i>Jour de d'index schizonte maximum</i>	Moyenne	14,2	14,2	16 ;4
	Range	[12 ;17]	[12 ;17]	[13 ;22]
<i>Intervalle premier jour de schizonte-pic de schizontes</i>	Moyenne	5,6	3,5	2,67
	Range	[4 ;7]	[2 ;10]	[2 ;6]

Absence de différence statistiquement significative au risque de 5 p. cent entre le groupe Témoin et les deux autres groupes de veaux.

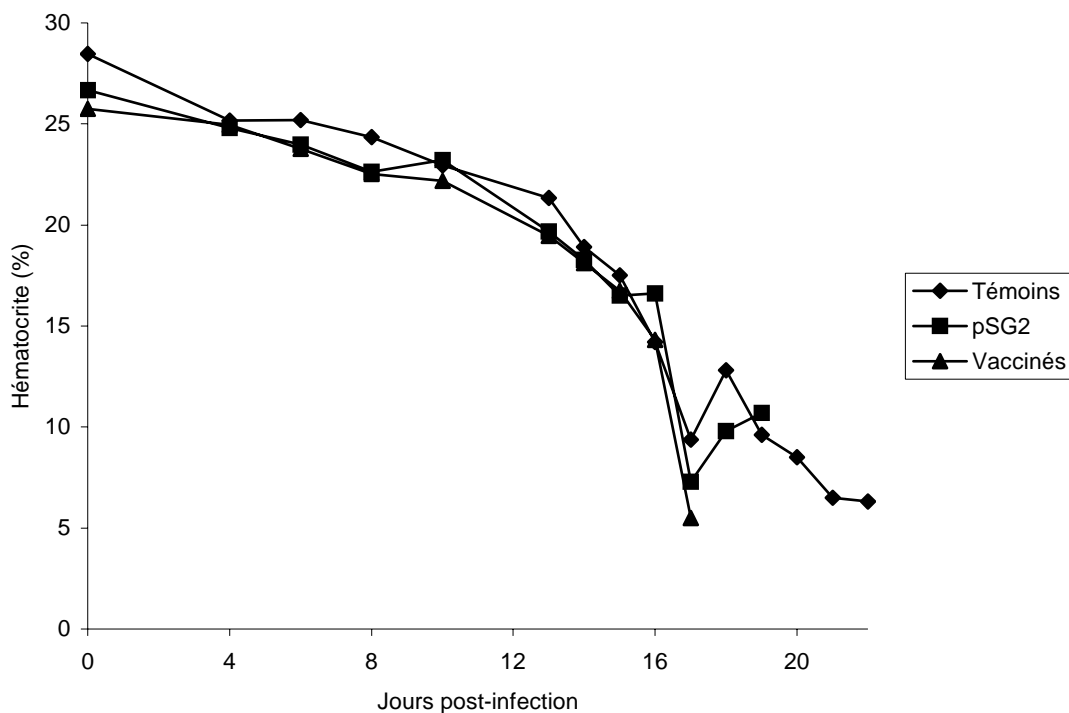


**Figure 4**  
Parasitémie moyenne dans les groupes Vaccinés, pSG2 et Témoin



**Figure 5**  
Index Schizonte moyen dans les groupes Vaccinés, pSG2 et Témoin

La moyenne de l'hématocrite par groupe a été consignée sur la Figure 6.



**Figure 6**  
**Evolution de l'hématocrite moyen par groupe**

L'hématocrite moyen chez les trois groupes diminue à partir de J5 post-infection, il atteint son minimum chez les veaux appartenant aux trois groupes à J16. Les hématocrites moyens évoluent de la même manière chez les trois groupes de veaux durant toute la période allant de la date d'infection expérimentale jusqu'à la mort (Figure 6, Tableau V).



**Tableau V**  
**Indicateurs relatifs à l'hématocrite dans les trois groupes de veaux** (les valeurs sont données en moyenne)

Indicateur clinique	Indicateur	Groupe de veaux		
		1 (Vaccinés)	2 (pSG2)	3 (Témoin)
<i>Jour de minimum d'hématocrite</i>	Moyenne	15,7 <sup>a</sup>	15,7 <sup>a</sup>	16,8 <sup>a</sup>
	Range	[14;17]	[13;18]	[16;17]
<i>Valeur minimale de l'hématocrite</i>	Moyenne	13,2 <sup>a</sup>	12,1 <sup>a</sup>	9,9 <sup>a</sup>
	Range	[5,5 ;18,2]	[5,1;21,9]	[5,6;12,8]
<i>Variation relative des hématocrites</i>		-44,5 <sup>a</sup>	-52,4 <sup>a</sup>	-65,3 <sup>a</sup>

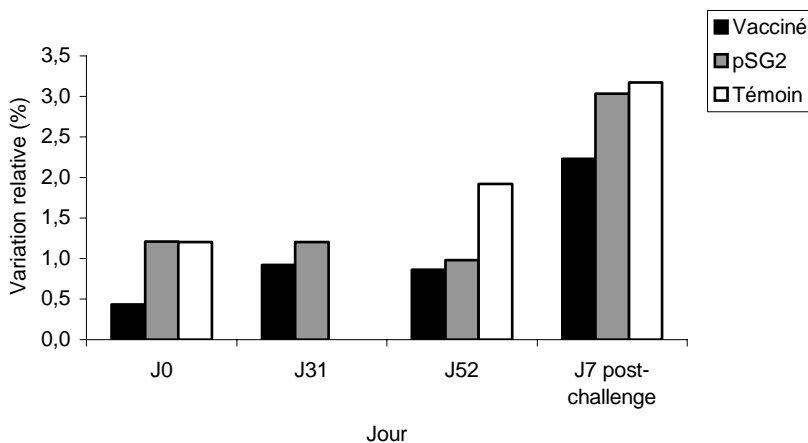
Les groupes avec des lettres différentes indiquent la présence d'une différence statistiquement significative avec le Groupe Témoin.

#### **-II-4- Immunofluorescence indirecte**

L'immunofluorescence indirecte à J0, J7 et J14 post-infection d'épreuve, n'a pas permis de noter de cas de séroconversion à la dilution de 1/40 après vaccination par les antigènes de schizontes.

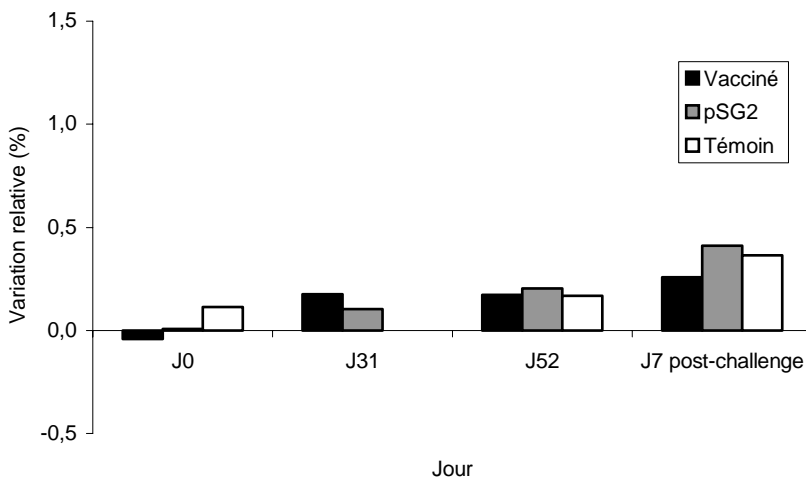
#### **-II-5- Test de transformation lymphoblastique (TTL)**

Les TTL ont été réalisés pour tous les veaux, avec les quatre antigènes (CL10, PIM, Tash HN, Tash AT 3) ainsi qu'un mélange de ces quatre Ag. Les résultats obtenus dans les trois groupes de veaux ont été représentés aux Figures 7 à 12.

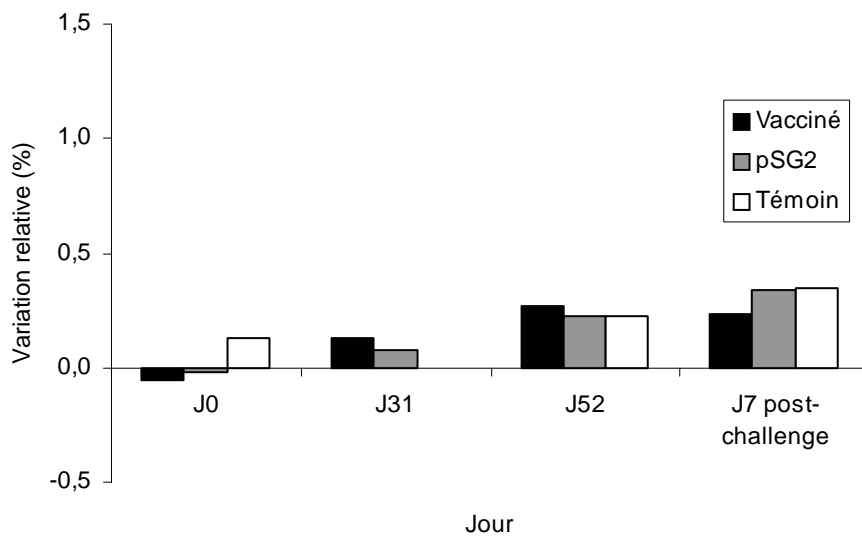


**Figure 7**  
**Résultats moyens du test de transformation lymphoblastique avec la PHA dans les trois groupes de veaux**

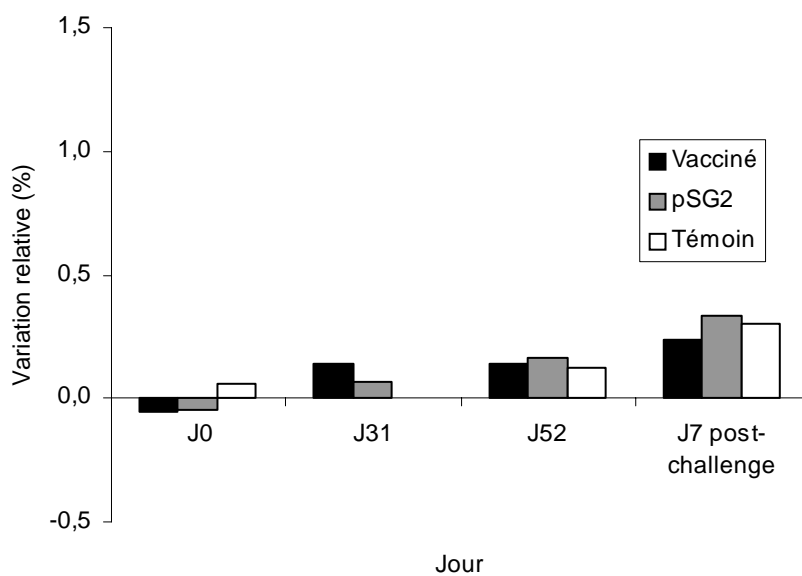
Comme le montre la Figure 7, la prolifération cellulaire à la PHA est élevée dans les trois groupes à différentes dates, et notamment à J7 post-infection d'épreuve.



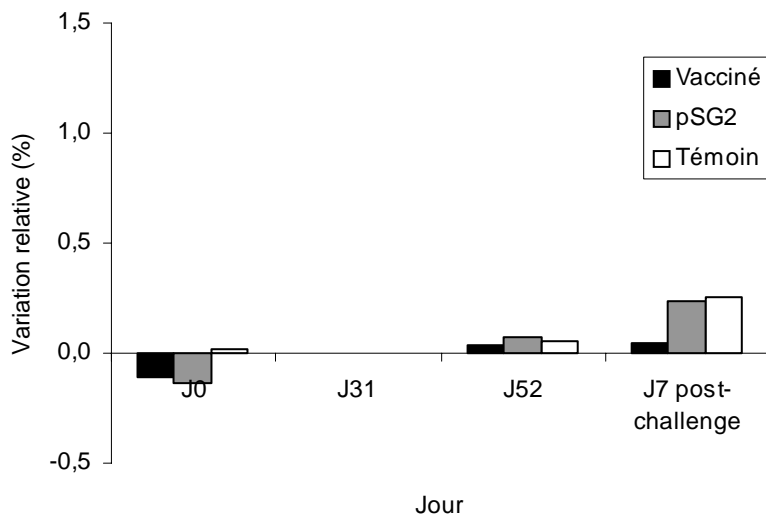
**Figure 8**  
**Résultats moyens du test de transformation lymphoblastique avec l'Ag CL10 dans les trois groupes de veaux**



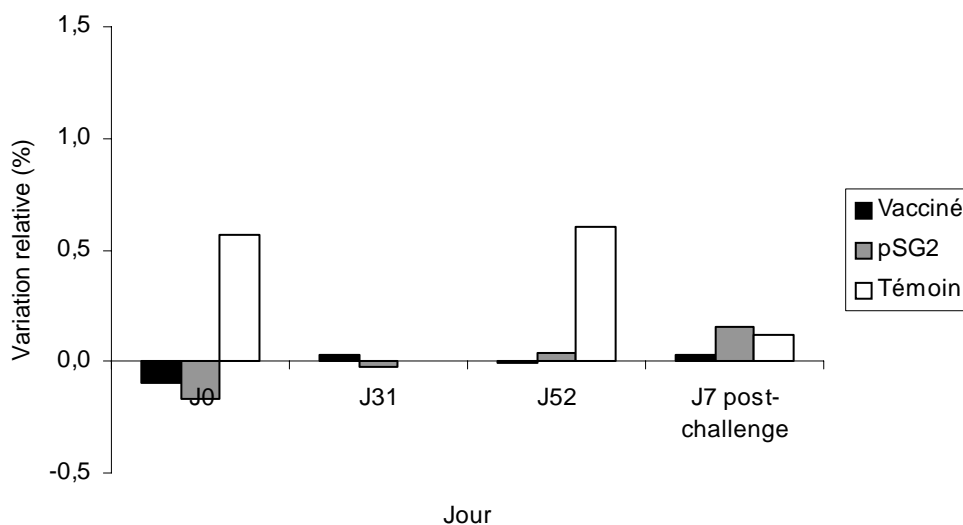
**Figure 9**  
**Résultats moyens du test de transformation lymphoblastique avec l'Ag Tash AT 3 dans les trois groupes de veaux**



**Figure 10**  
**Résultats moyens du test de transformation lymphoblastique avec l'Ag Tash HN dans les trois groupes de veaux**



**Figure 11**  
**Résultats moyens du test de transformation lymphoblastique avec l'Ag PIM dans les trois groupes de veaux**



**Figure 12**  
**Résultats moyens du test de transformation lymphoblastique avec un mélange des quatre Ag (CL10 + PIM + Tash HN + Tash AT 3) dans les trois groupes de veaux**

Relativement à la PHA, de faibles niveaux de proliférations cellulaires ont été notés pour les Ag utilisés et notamment le CL 10, le Tash HN et le Tash AT 3 à différentes dates et pour les trois groupes de veaux, et en particulier à J7 post-infection expérimentale. En présence d'un mélange des quatre Ag, nous notons pratiquement l'absence de prolifération cellulaire en particulier dans le groupe vacciné ainsi que le groupe pSG2.

L'examen au microscope optique des étalements de cultures cellulaires à différentes dates n'a pas permis la mise en évidence de schizontes au niveau des étalements provenant de tous les animaux stimulés par tous les antigènes.

### **-III- Discussion**

L'approche « *prime-boost* » est une stratégie de vaccination qui a été utilisée pour immuniser l'homme et les animaux contre plusieurs maladies virales, parasitaires et bactériennes (Boulter et al., 1998 ; Nyika et al., 2002 ; Gonzalo et al., 2002 ; Gilbert et al., 2002 ; Moorthy et al., 2004 ; Musoke et al., 2005). La vaccination avec le protocole de « *prime-boost* » induit une immunité meilleure que l'administration des protéines recombinantes seules ou le virus recombinant seul (Fuller et al., 1997 ; Gonzalo et al., 2002). Ainsi, un essai de vaccination contre les infections au VIH chez des singes macaques par l'approche de « *prime-boost* » a induit une production d'Ac sept fois (en moyenne géométrique) plus importante que les antigènes recombinants injectés seuls (Fuller et al., 1997). De même, la réponse T dépendante - surtout cytotoxique (Palmowski et al., 2002) est plus importante avec cette approche qu'avec des antigènes injectés seuls (Gilbert et al., 2005). Jusqu'à aujourd'hui, le mécanisme par lequel les sujets primo-vaccinés avec une (ou des) protéine(s) et par la suite bénéficiant d'un rappel avec de l'ADN induit une synergie n'est pas compris.

Dans le présent essai, quatre antigènes exprimés par les parasites appartenant au genre *Theileria* ont été utilisés comme candidats vaccinaux. L'antigène PIM (*polymorphic immunodominant molecule*) est exprimé par les

schizontes et les sporozoïtes de *T. parva* (Matete et al., 2004). Le PIM est un orthologue (homologue fonctionnel) d'un autre antigène de *T. annulata* : TaSP (*Theileria annulata surface protein*) avec lequel il présente une homologie de 93 p. cent.

Le choix de l'approche du « *prime-boost* » avec rappel par le MVA a été utilisé ici dans le but de favoriser l'apparition d'une réponse T cytotoxique CD8+ contre les antigènes administrés aux veaux, sachant par ailleurs, que ce système vaccinal a permis d'induire une protection relative dans un essai antérieur utilisant l'Ag Tams et SPAG-1 de *T. annulata* (Cf. deuxième partie expérimentale).

Nous avons utilisé dans le présent essai la voie intradermique car celle-ci représente la voie la plus intéressante pour induire une réponse de type Th1 comme l'ont montré plusieurs auteurs avec différents agents pathogènes, *P. berghei* (Shneider et al., 2001), *Leishmania* (Gonzalo et al., 2002), *Cowdria ruminantium* (Nikya et al., 2002). De plus, l'utilisation de cette voie dans un essai antérieur (Cf. deuxième partie expérimentale) nous a permis de noter l'induction d'une protection relative en utilisant une association des antigènes Tams et SPAG-1 de *T. annulata*.

Tous les indicateurs cliniques et parasitologiques utilisés dans le présent essai montrent qu'il n'existe pas de différence significative entre le groupe d'animaux ayant reçu le plasmide vide (pSG2) et le MVA nu et le groupe de veaux témoins. Ce résultat confirme donc l'absence d'un effet non spécifique du système de routage que nous avons employé dans le présent essai. En effet, il est bien établi que les motifs CpG plasmidiques ont des propriétés immuno-stimulantes chez les bovins (Nichani et al., 2004). Cependant, celles-ci ne peuvent être bénéfiques que lors de montage d'une réponse immune spécifique.

Dans le présent travail, l'administration des quatre antigènes de schizontes : Clone 10, PIM, Tash AT 3 et Tash HN selon l'approche de « *prime-boost* » hétérologue avec rappel par du MVA recombinant, n'a pas permis la mise en évidence, pour l'ensemble des indicateurs utilisés, de différence significative avec

les 2 groupes témoins après infection d'épreuve par une souche virulente de *T. annulata*. En effet, cette étude a démontré l'absence de toute induction d'effet protecteur même relatif, et ce aussi bien pour les critères cliniques et de survie, que ceux parasitologiques utilisés dans le présent travail.

L'utilisation de la technique sérologique d'IFI n'a pas permis la mise en évidence d'Ac anti-schizontes de *T. annulata* et ce même à de faibles dilutions (1/40). Cependant, compte tenu de la haute spécificité de la réponse sérologique recherchée, ce résultat négatif présente une faible valeur informative et devra être validé par l'utilisation d'ELISA, spécifique des Ag employés dans la vaccination. Cependant, il est intéressant de relever ici que le « *prime-boost* » hétérologue avec rappel par du MVA peut s'accompagner de l'absence de détection de réponse humorale comme noté en particulier dans l'essai précédent avec le Tams ainsi que lors d'immunisation de l'homme par l'Ag CSP de *P. falciparum* (Epstein et al., 2004).

Les TTL conduits dans le présent travail n'ont pas permis de révéler une prolifération significative après vaccination des veaux par les quatre Ag de schizontes. Néanmoins, nous avons noté, en particulier à J7 post-infection d'épreuve une prolifération cellulaire modérée chez aussi bien le groupe vacciné que chez les deux groupes témoins et ce avec les différents Ag utilisés séparément (Figures 7 à 11). Au contraire, lors de mélange des quatre Ag aucune prolifération n'a été notée. Cette superposition des résultats obtenus dans les trois groupes et en particuliers ceux témoins pourrait être due à une interférence de l'état d'infection avec la stimulation des lymphocytes à J7 post-infection d'épreuve. Par ailleurs, la présence d'une tendance, quoique plus réduite, à la prolifération dans les trois groupes notamment à J52 amène à se questionner sur la présence d'une activation non spécifique des cellules T par les préparations d'Ag recombinants utilisés individuellement. Ces résultats seraient à mieux analyser notamment par la caractérisation de cytokines typiques de profil Th1 ou Th2 sur les cellules en prolifération.

L'absence de protection notée dans le présent essai peut être expliquée par plusieurs hypothèses :

(i) L'échec du système de routage des antigènes, bien que comme évoqué précédemment, le même système de routage ait pu induire une protection relative avec l'Ag Tams de *T. annulata*, cependant cette éventualité ne peut être totalement éliminée ici notamment en l'absence d'indicateur du montage d'une réponse immunitaire spécifique aux Ag utilisés.

(ii) L'absence d'effet protecteur des antigènes ciblés. En effet, les quatre antigènes de schizonte que nous avons utilisés ont été choisis de manière relativement empirique, il serait tout à fait possible qu'il ne soient pas impliqués dans le montage d'une réponse immunitaire protectrice.

(iv) Présence d'un polymorphisme antigénique notamment bien établi avec l'Ag PIM, en effet ce dernier est polymorphe et présente un poids moléculaire variant entre 70 et 90 kDa (Matete et al., 2004). Le gène *pim* comporte une partie centrale variable, flanqué en 5' et 3' par deux parties conservées (Gysen et al., 2004). Ce polymorphisme antigénique pourrait être à l'origine d'un défaut d'immunité lors de l'injection de souches hétérologues. Ainsi, Schneider et al. (2001) ont expliqué l'absence de protection chez des chimpanzés vaccinés par l'Ag TRAP de *P. falciparum* (*Thrombospondin Related Adhesive Protein*) et exposé à un challenge hétérologue, par la présence d'une différence en résidus aminés entre le variant vaccinal et celui de la souche utilisée dans l'infection d'épreuve. Cependant, même en présence de peptides présentant une diversité antigénique importante comme les Ag Tams et SPAG-1 de *T. annulata*, il y a persistance d'une immunité croisée responsable de la présence d'une protection partielle comme notée aussi bien dans l'essai précédent (Cf. deuxième partie expérimentale) que dans un autre travail (Darghouth et al., soumis pour publication). Un phénomène similaire a été rapporté par Conze et al. (1998) lors d'essai de cytotoxicité *in vitro* avec des cellules lymphocytaires provenant d'animaux immunisés par des isolats parasitaires distincts.

En définitive, le présent essai semble montrer l'absence d'induction d'une protection même partielle après vaccination par les quatre Ag de schizontes administrés par « *prime-boost* » hétérologue. Devant ce résultat négatif, nous nous



proposons de continuer l'analyse des résultats du présent essai en procédant, à la réalisation de test ELISA spécifique aux antigènes utilisés et éventuellement à la détermination des isotypes d'Immunoglobulines G et à la quantification de cytokines spécifique de profil Th1 ou Th2 de la réponse immune dans les surnageants des TTL notamment à J52 et J7 post challenge. Par ailleurs, l'immunogénicité des antigènes utilisés pourrait être vérifiée par leur capacité à induire des proliférations lymphocytaires significatives chez des animaux rétablis de theilériose tropicale expérimentale ou naturelle. Les données complémentaires que pourrait fournir cette approche permettront de mieux analyser les résultats du présent essai vaccinal et de s'orienter soit vers de nouveaux candidats antigéniques soit de nouvelles alternatives de routage de ces derniers.

## Références

- [1] Ben Hadj Ahmed S., Bahloul C., Robbana C., Askri S., Dellagi K. 2004. A comparative evaluation of the DNA vaccine candidates against experimental murine leishmaniasis due to *L. major*. *Vaccine*, 1631-1639.
- [2] Blanchard T.J., Alcamì A., Andrea P., Smith G.L. 1998. Modified vaccinia virus Ankara undergoes limited replication in human cells and lacks several immunomodulatory proteins: implications for uses as a human vaccine. *J. Gen. Virol.*, 79 : 1159–1167.
- [3] Boulter N., Brown D., Wilkie G., Williamson S., Kirvar E., Knight P., Glass E., Campbell J., Morzaria S., Nene V., Musoke A., d'Oliveira C., Gubbels M.J., Jongejan F., Hall R. 1999. Evaluation of recombinant sporozoite antigen SPAG-1 as a vaccine candidate against *Theileria annulata* by the use of different delivery systems. *Trop. Med. Int. Health*, 4 : A71-A77.
- [4] Boulter N.R., Brown C.G., Kirvar E., Glass E., Campbell J., Morzaria S., Nene V., Musoke A., D'Oliveira C., Gubbels M.J., Jongejan F., Hall F.R. 1998. Different vaccine strategies used to protect against *Theileria annulata*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 849 : 234-46.
- [5] Boulter N.R., Glass E.J., Knight L., Bell-sakyi L., Brown C.G.D., Hall R. 1995. *Theileria annulata* sporozoite antigen fused to hepatitis B core antigen used in vaccination trial. *Vaccine*, 13 (13) : 1152-1160.
- [6] Bouslikhane M., Kachani M., Ouhelli M. 1998, La theilériose bovine au Maroc, investigations épidémiologiques et étude de l'impact sur la productivité des élevages. Résumé de communication orale, 15 ème

- congrès vétérinaire maghrébin, Hammamet, Tunisie, 5 - 6 mai 1998.
- [7] Brown C.G.C. 1983. *Theileria* in Jensen (J.B.J.) Ed. *In vitro* cultivation of protozoan parasites. CRC press. pp. 243-284.
- [8] Brown C.G.D. 1990. Control of tropical theileriosis (*Theileria annulata* infection) of cattle. *Parassitologia*, 32 : 23-31.
- [9] Conze G., Campbell J.D., Nichani A.K., Glass E.J., Spooner R.L., Ahmed J.S. 1998. Evidence for strain specificity in cytotoxic T-lymphocyte-mediated, major histocompatibility complex class I-dependent killing of *Theileria annulata*-infected cells. *Parasitol Res.*, 84 : 593-5.
- [10] Darghouth M.A., Bouattour A., Ben Miled L., Sassi L. 1996. Diagnosis of *Theileria annulata* infection of cattle in Tunisia : comparison between serology and blood smears. *Vet. Res.*, 27 : 613-621.
- [11] Darghouth M.A., Boulter N., Gharbi M., Tait A., Hall R. Vaccination of calves with an attenuated cell line of *Theileria annulata* and the sporozoïte antigen SPAG-1 produces synergistic effect. Soumis pour publication.
- [12] d'Oliveira C., Tijhaar E.J., Shiels B.R., van der Weide M., Jongejan F. 1996. Expression of genes encoding two major *Theileria annulata* merozoite surface antigens in *Escherichia coli* and a *Salmonella* Typhimurium aroA vaccine strain. *Gene*, 172 : 33-9.
- [13] d'Oliveira C., Feenstra A., Vos H., Osterhaus A.D., Shiels B.R., Cornelissen A.W., Jongejan F. 1997. Induction of protective immunity to *Theileria annulata* using two major merozoite surface antigens presented by different delivery systems. *Vaccine*, 16 :1796-804.
- [14] Drexler I., Heller K., Wahren B., Erfle V. and Sutter G. 1998. Highly attenuated modified vaccinia virus Ankara replicated baby hamster kidney cells, a potential host for virus propagation, but not in various human transformed primary cells. *J. Gen. Virol.*, 79 : 347-352.
- [15] Epstein J.E., Charoenvit Y., Kester K.E., Wang R., Newcomer R., Fitzpatrick S., Richie T.L., Tornieporth N., Heppner D.G., Ockenhouse C., Majam V.,

- Holland C., Abot E., Ganeshan H., Berzins M., Jones T., Freyberg C.N., Ng J., Norman J., Carucci J.D., Cohen J., Hoffman S.L. 2004. Safety, tolerability, and antibody responses in humans after sequential immunization with a PfCSP DNA vaccine followed by the recombinant protein vaccine. *Vaccine*, 22, (13-14) : 1592-1603.
- [16] Fuller D.H., Corb M.M., Barnett S., Steimer K., Haynes J.R. 1997. Enhancement of immunodeficiency virus-specific immune responses in DNA-immunized rhesus macaques. *Vaccine*, 8 : 924-926.
- [17] Geysen D., Bazarusanga T., Brandt J., Dolan T.T. 2004. An unusual mosaic structure of the PIM gene of *Theileria parva* and its relationship to allelic diversity. *Mol. & Biochem. Parasitol.*, 133 : 163-174.
- [18] Geysen D., Bishop R., Skilton R., Dolan T.T., Morzaria S. 1999. Molecular epidemiology of *Theileria parva* in the field. *Tropical Medicine and International Health*, 9 : a21–a27.
- [19] Gilbert S.C., Moorthy V.S., Andrews L., Pathan A.A., McConkey S.J., Vuola J.M., Keating S.M., Berthoud T., Webster D., McShane H., Hill A.V. 2005. Synergistic DNA-MVA prime-boost vaccination regimes for malaria and tuberculosis. *Vaccine*, Sous presse.
- [20] Gilbert S.C., Schneider J., Hannan C.M., Hu J.T., Plebanski M., Sinden R., Hill A.V. 2002. Enhanced CD8 T cell immunogenicity and protective efficacy in a mouse malaria model using a recombinant adenoviral vaccine in heterologous prime-boost immunisation regimes. *Vaccine*, 7-8 : 1039-1045.
- [21] Gonzalo R.M., del Real G., Rodriguez J.R., Rodriguez D., Heljasvaara R., Lucas P., Larraga V., Esteban M. 2002. A heterologous prime-boost regime using DNA and recombinant vaccinia virus expressing the *Leishmania infantum* P36/LACK antigen protects BALB/c mice from cutaneous leishmaniasis. *Vaccine*, 7-8 : 1226-1231.
- [22] Hall R., Boulter N.R., Brown C.G.D., Wilkie G., Kirvar E., Nene V., Musoke J., Glass E.J., Morzaria S.P. 2000. Reciprocal cross-protection induced by

- sporozoïte antigen SPAG-1 from *Theileria annulata* and p67 from *Theileria parva*. Parasite immunol., 22 : 223-230.
- [23] Kaba S.A., Hemmes J.C., van Lent J.W., Vlak J.M., Nene V., Musoke A.J., van Oers M.M. 2003. Baculovirus surface display of *Theileria parva* p67 antigen preserves the conformation of sporozoite-neutralizing epitopes. Protein Eng., 1 :73-8.
- [24] Karagenç T. 2002. Development of ELISA test in tropical theileriosis. Atelier sur l'optimisation et la standardisation du diagnostic et du dépistage des maladies transmises par les tiques dans la Région du Maghreb. 11 - 14 Décembre 2002, Gammarth, Tunisie.
- [25] Maas R-M., Götz J., Wohlleben W., Muth G. 1998. The conjugative plasmid pSG5 from *Streptomyces ghanaensis* DSM 2932 differs in its transfer functions from other *Streptomyces ghanaensis* rolling-circle-type plasmid. Microbiol., 144 : 2809-2817.
- [26] Matete G.O., Kanyari P.W.N., Ngatia T.A., Karuiki D.P., Ndung'u S.G. 2004. Characterisation of *Theileria parva* isolates from Kiambu district, Kenya. Vet. Parasitol., 121: 247-253.
- [27] Moorthy V.S., Imoukhuede E.B., Milligan P., Bojang K., Keating S., Kaye P., Pinder M., Gilbert S.C., Walraven G., Greenwood B.M., Hill A.S. 2004. A randomised, double-blind, controlled vaccine efficacy trial of DNA/MVA ME-TRAP against malaria infection in Gambian adults. PLoS Med. 1(2):e33. Epub 2004 Oct 26.
- [28] Moss B., Earl P.L. 2002. Overview of the Vaccinia Virus expression system. Current Protocols in Molecular Biology, Ed. John Wiley and Sons. 16.15.1-16.15.5.
- [29] Musoke A., Rowlands J., Nene V., Nyanjui J., Katende J., Spooner P., Mwaura S., Odongo D., Nkonge C., Mbogo S., Bishop R., Morzaria S. 2005. Subunit vaccine based on the p67 major surface protein of *Theileria parva* sporozoites reduces severity of infection derived from field tick challenge. Vaccine, 23 : 3084-95.

- [30] Nichani A.K., Mena A., Popowych Y., Dent D., Townsend H.G.G., Mutwiri G.K., Hecker R., Babiuk L.A., Griebel P.J. 2004. *In vivo* immunostimulatory effects of CpG oligodeoxynucleotide in cattle and sheep. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 98 : 17-29.
- [31] Nyika A., Barbet A.F., Burridge M.J., Mahan S.M. 2002. DNA vaccination with map1 gene followed by protein boost augments protection against challenge with *Cowdria ruminantium*, the agent of heartwater. *Vaccine*, 7-8 : 1215-1225.
- [32] Palmowski M.J., Choi E.M., Hermans I.F., Gilbert S.C., Chen J.L., Gileadi U., Salio M., Van Pel A., Man S., Bonin E., Liljestrom P., Dunbar P.R., Cerundolo V. 2002. Competition between CTL narrows the immune response induced by prime-boost vaccination protocols. *J Immunol.*, 9 : 4391-4398.
- [33] Paoletti E. 1996. Applications of pox virus vectors to vaccination: an update. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 21 : 11349-11353.
- [34] Pipano E., Shkap V. 2004. *Theileria annulata* theileriosis. In *Infectious diseases of livestock*. Coetzer & Tustin (Editors), Oxford University press, UK. 486-497.
- [35] Pipano E., Tsur I. 1966. Experimental immunisation against *Theileria annulata* using a tissue culture vaccine. *Refuah Veterinarith.* 23: 186-194.
- [36] Ramshaw I.A., Ramsay A.J. 2000. The prime-boost strategy: exciting prospects for improved vaccination. *Immunol. Today*, 4 : 163-165.
- [37] Schneider J., Langermans J.A., Gilbert S.C., Blanchard T.J., Twigg S., Naitza S., Hannan C.M., Aidoo M., Crisanti A., Robson K.J., Smith G.L., Hill A.V., Thomas A.W. 2001. A prime-boost immunisation regimen using DNA followed by recombinant modified vaccinia virus Ankara induces strong cellular immune responses against the *Plasmodium falciparum* TRAP antigen in chimpanzees. *Vaccine*, 32 : 4595-4602.
- [38] Schnittger L., Katzer F., Biermann R., Shayan P., Boguslawski K., McKellar S., Beyer D., Shiels B.R., Ahmed J.S.. 2002. Characterization of a polymorphic *Theileria annulata* surface protein (TaSP) closely related to PIM

- of *Theileria parva*: implications for use in diagnostic tests and subunit vaccines. Mol. & Biochem. Parasitol., 120 : 247-256.
- [39] Schwartz D. 1993. Méthodes statistiques à l'usage des médecins et des biologistes. Troisième édition. Ed. Flammarion, Paris. 318 pp.
- [40] Schwartz D., Flamant R., Lellouch J. 1981. L'essai thérapeutique chez l'homme. Ed. Flammarion, Paris. 297 pp.
- [41] Swan D.G., Stadler L., Okan E., Hoffs M., Katzer F., Kinnaird J., McKellar S., Shiels B.R. 2003. TashHN, a *Theileria annulata* encoded protein transported to the host nucleus displays an association with attenuation of parasite differentiation. Cell Microbiol., 12 : 947-56.
- [42] Swan D.G., Stern R., McKellar S., Phillips K., Oura C.A.L., Karagenc T.I., Stadler L., Shiels B.R. 2001. Characterisation of a cluster of genes encoding *Theileria annulata* AT hook DNA-binding proteins and evidence for localisation to the host cell nucleus. Journal of Cell Science, 114 : 2747-2754.
- [43] Tait A., Hall F.R. 1990. *Theileria annulata*: control measures, diagnosis and the potential use of subunit vaccines. Revue Scientifique et Technique Office International des Epizooties, 9 : 387-403.
- [44] Toye P., Nyanjui J., Goddeeris B., Musoke A.J. 1996. Identification of neutralization and diagnostic epitopes on pim, the polymorphic immunodominant molecule of *theileria parva*. Infection & Immunity, 5 : 1832-1838.
- [45] Wohlleben W., Puhler A. 1987. The *Streptomyces ghanaensis* low copy plasmid pSG2 and its use for vector construction. Arch. Microbiol. 4 : 298-304.
- [46] Wohlleben W., Puhler A. 1987. The *Streptomyces ghanaensis* low copy plasmid pSG2 and its use for vector construction. Arch. Microbiol., 148 (4) : 298-304
- [47] Woodland D.L. 2004. Jump-starting the immune system : prime-boost comes of age. Trends Immunol., 2 : 98-104.

## Conclusion générale

La theilériose tropicale est une maladie de grande importance médicale et économique. La prophylaxie contre cette parasitose repose sur des mesures de lutte anti-vectorielle et l'utilisation de vaccins vivants atténués. Dans le contexte épidémiologique tunisien caractérisé par l'apparition de la theilériose essentiellement dans les petits élevages de bovins où les mesures de lutte anti-vectorielle restent associées à une faible acceptabilité et applicabilité, les vaccins atténués apparaissent comme un outil de grand intérêt pratique du fait de leur efficacité dans la réduction des risques de maladie. De ce fait, notre attention s'est porté dans ce travail, sur l'évaluation pour la première fois avec la theilériose tropicale de l'intérêt économique d'un vaccin vivant atténué classique ainsi que sur des essais de vaccination avec de l'ADN parasitaire réalisés pour la première fois sur des bovins dans le cadre de l'immunisation contre *T. annulata* par l'approche « *prime-boost* ».

Une analyse économique de la vaccination par une souche atténuée autochtone a été menée dans des étables en situation d'endémie stable de theilériose tropicale en ciblant la catégorie à risque de maladie, c'est à dire les veaux en première saison estivale. Cette analyse a montré qu'en absence de vaccination, l'impact de la theilériose tropicale est globalement très élevé 15115,058 TD (9388,20 €).

Le coût d'un cas clinique a été évalué à 286,287 DT (177,82 €), et celui d'une forme sub-clinique avec anémie à 304,710 DT (189,26 €). Ces indicateurs financiers nous ont permis d'estimer, le ratio bénéfice-coût de la vaccination qui est de 23,7.



La recherche visant le développement de vaccins sous-unitaires efficaces contre la theilériose tropicale dépend aussi bien de l'identification d'antigène à capacité protectrice que de l'identification d'un système de routage privilégiant le montage d'une réponse immune protectrice. Dans ce contexte, nous avons évalué l'apport d'une stratégie de vaccination par ADN parasite suivant l'approche « *prime-boost* ». Trois types d'antigènes ont été testés : un antigène de sporozoïte (SPAG-1), un antigène de mérozoïte (Tams) et enfin, cinq antigènes de schizonte (PIM, Tash HN, Tash AT3, CL10) testés ici pour la première fois. Les résultats obtenus dans une série de deux essais successifs confirment l'intérêt de cette approche vaccinale en particulier avec les antigènes SPAG-1 et Tams. De plus, les résultats obtenus soulignent l'intérêt de l'utilisation de vaccins multi-antigènes dans le cas de la theilériose tropicale.

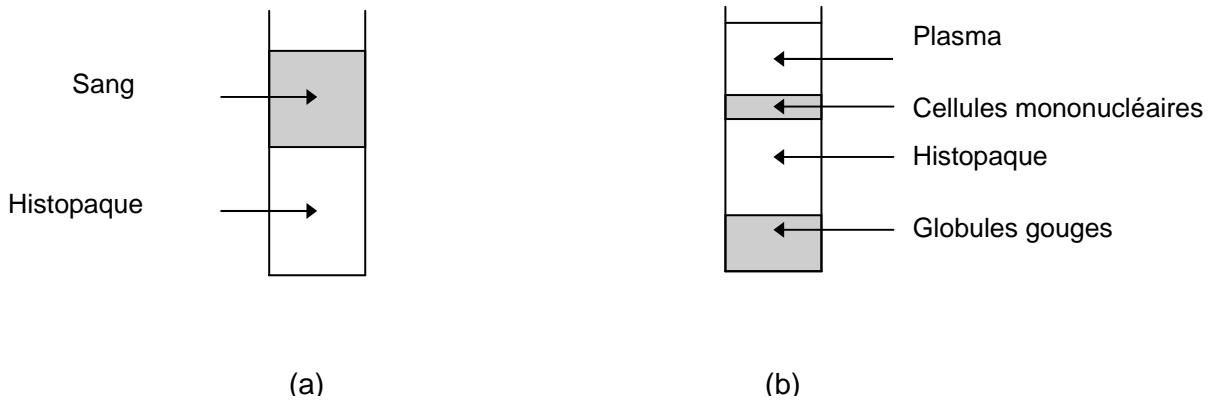
En définitive, notre travail nous a permis de révéler la haute pertinence économique de la vaccination par une lignée parasite atténuée dans l'état d'endémie stable. Ce résultat représente une étape importante vers l'évaluation de l'intérêt de la vaccination sur le plan national tunisien en ciblant les autres états d'endémie. Cette approche pourrait représenter un important justificatif pour optimiser cet outil de lutte, notamment d'une part en l'absence, à moyen et court terme, d'autres alternatives pratiques et tout aussi efficaces d'immunisation, et d'autre part du désintéressement des grands groupes pharmaceutiques, et donc de la recherche sur fonds privés, de ce type de vaccins.

Les résultats positifs générés par l'utilisation des antigènes SPAG-1 et Tams en suivant l'approche « *prime-boost* » soulignent la faisabilité de la vaccination par ADN et montrent l'importance des systèmes de routage des antigènes dans le succès de l'immunisation contre la theilériose tropicale. L'échec de l'essai de vaccination par des antigènes de schizontes illustre quant à lui la nécessité autant que possible d'une évaluation préliminaire des antigènes candidats sur la base d'indicateurs immunologiques permettant de mieux prédire leur reconnaissance par le système immunitaire voire leur implication dans l'induction de réponse potentiellement protectrice.

Le succès de la vaccination contre la theilériose tropicale dépendra probablement à court et moyen terme de l'optimisation de l'utilisation des schizontes atténués, et à long terme du développement de nouveaux vaccins sous-unitaire multi-antigéniques potentialisés par des systèmes de routage appropriés.

## Annexe 1

### Etapes de la technique de Ficoll (Histopaque ©, Sigma)



(a) avant centrifugation

(b) après centrifugation

## Annexe 2

### Composition du RPMI 1640 (Gibco BRL) stérile

RPMI 1640 (Gibco BRL)

10 p. 100 de sérum de veau fœtal (Gibco BRL)

$5 \cdot 10^{-5}$  Molaire de Mercaptoéthanol (Sigma)

0,1 ml/100 ml de Pénicilline – Streptomycine (Sigma). La solution mère tire respectivement  $10^5$  UI et 0,1 g / ml de Pénicilline et de streptomycine.

1 p. cent L glutamine (Gibco BRL)

Si ce mélange a été préparé depuis plus que 15 jours, nous avons rajouté de la L glutamine (Gibco BRL) à la concentration de 1 p. cent.

Le mélange est stérilisé par filtration avec un filtre à 0,2  $\mu\text{m}$ .

Afin de s'assurer de la stérilité du milieu complet de RPMI préparé, nous avons effectué pour chaque lot, un test de stérilité qui consiste à placer 1 ml dans l'étuve à 37°C dans une atmosphère de 5 p. cent de  $\text{CO}_2$  pendant deux jours. Le tube est examiné pour la

recherche d'une turbidité ou la formation d'un culot. Le lot est considéré stérile si la solution demeure limpide.

### **Annexe 3**

## **Plaque ELISA utilisée dans le test de transformation lymphoblastique**

Au total, pour chaque animal nous avons procédé a la mise en place de 18 puits. Par exemple pour l'animal x, les puits au niveau de la plaque sont agencés comme suit :

<i>Témoin -</i>	<i>Témoin +</i>	<i>Clone 10</i>	<i>Ta Sh HN</i>	<i>Ta Shat 3</i>	<i>PIM</i>
Puits 1a	Puits 2a	Puits 3a	Puits 4a	Puits 5a	Puits 6a
Puits 1b	Puits 2b	Puits 3b	Puits 4b	Puits 5b	Puits 6b
Puits 1c	Puits 2c	Puits 3c	Puits 4c	Puits 5c	Puits 6c

### **Annexe 4**

## **Préparation du SBTI**

Après avoir été retiré de l'azote liquide, le tube de GUTS est placé rapidement dans un bain marie à +37°C, on laisse équilibrer pendant 30 minutes à température ambiante. Il est ensuite mélangé avec 30 ml de MEM (Gibco BRL) (*Minimum Essential Medium*) porté à +37°C et contenant :

- 7,5 p. cent de glycérol
- 1 p. cent de L Glutamine (Gibco BRL)
- 3,5 p. cent d'Albumine Plasmique Bovine (Gibco BRL)

Le GUTS est homogénéisé et placé dans des seringues individuelles de 1 ml chacun. Il a été rapidement injecté aux veaux.

## Annexe 5 Prélèvements effectués sur les veaux

### Interventions effectuées sur les animaux avant l'infection expérimentale

	<i>J 0</i>	<i>J 21</i>	<i>J 31</i>	<i>J 42</i>	<i>J 52</i>
Sérum	x	x	x	x	x
Température	x	x	x	x	x
Sang/EDTA	x				
TTL	x		x		x

TTL : Test de Transformation Lymphoblastique

### Interventions effectuées sur les animaux après l'infection expérimentale

	<i>J 7</i>	<i>J 14</i>	<i>J 21</i>
Sérum	x	x	x
Examen clinique	Bi-quotidien		
Prise de température	Quotidienne		
Etalements sanguins et de nœuds lymphatiques	3 x / semaine		
Hématologie	3 x / semaine		
TTL	x		

TTL : Test de transformation lymphoblastique

# Résumé

La theilériose tropicale (*Theileria annulata*) est une maladie spécifique des bovinés représentant une contrainte majeure au développement de l'élevage intensif dans les pays d'endémie. La prophylaxie contre cette protozoose repose sur 2 types de mesures, la lutte anti-vectorielle et l'utilisation de vaccins vivants atténués.

La première partie de ce travail a consisté à estimer l'impact financier de la theilériose tropicale et l'intérêt économique de la vaccination par une lignée parasitaire atténuée. Cette évaluation a été effectuée sur un nombre total de 56 veaux et 12 vaches sentinelles dans trois élevages en état d'endémie stable qui ont été suivis pendant deux saisons estivales successives. Le coût total consécutif aux différentes formes d'infection par *Theileria annulata* (forme clinique, forme sub-clinique avec anémie et sans anémie) a été estimé à 15.115,058 Dinars Tunisiens (9.388,20 €). Une grande partie de ces coûts (50,81 p. cent) est due aux infections sub-cliniques. L'analyse par budgétisation partielle a permis d'estimer le ratio bénéfice-coût de la vaccination à 23,7. L'analyse de sensibilité montre que le point d'indifférence décisionnelle du prix du vaccin se situe à 118 Dinars Tunisiens (73,29 €).

La deuxième partie de ce travail a été consacrée à deux essais de vaccination contre la theilériose tropicale par de l'ADN parasitaire en utilisant l'approche « *prime-boost* ». Le premier essai a été réalisé sur un total de 20 veaux randomisés en un groupe témoin et 4 groupes d'animaux immunisés. Ces veaux ont été primo-vaccinés par des séquences d'ADN recombinants de sprozoïtes (antigène SPAG-1) ou de mérozoïtes (antigène Tams) de *Theileria annulata* dans le vecteur d'expression plasmidique pSG2 suivies par un rappel avec des protéines recombinantes (Groupes SPAG-1, Groupe Tams et Groupes mélange SPAG-1 et Tams) ou avec un virus recombinant de la vaccine (souche modifiée Ankara) (Groupe Tams/MVA). Tous les groupes d'animaux immunisés ont présenté une protection partielle contre une infection d'épreuve létale. Cependant, les niveaux de protection relative les plus élevés ont été notés chez les veaux des groupes SPAG-1/Tams et Tams. Le deuxième essai a été mené sur 17 veaux randomisés en 2 groupes témoins (Groupe plasmide vide et Groupe non immunisé) et un groupe de veaux vaccinés par un mélange de séquences d'ADN de quatre antigènes de schizontes (CL10, Tash AT 3, Tash HN et PIM) suivies par un rappel avec des virus recombinants de la souche modifiée Ankara. Cet essai n'a pas permis la mise en évidence d'indicateurs d'immunité post-vaccinale après exposition à une infection à dose létale. Globalement, ces résultats démontrent pour la première fois que l'approche « *prime-boost* » peut induire une réponse immunitaire protectrice contre la theilériose tropicale.

**Mots clés :** Theilériose tropicale, Bovins, Tunisie, Vaccination, Analyse coût bénéfice, *prime-boost*.

# Summary

Tropical theileriosis (*Theileria annulata*) is a specific disease of bovids which represent a major constraint to the development of intensive breeding in endemic countries. The control of this protozoonosis relies on two types of tools: the control of the vector and the use of live attenuated vaccines.

The first part of this work was conducted in order to estimate the financial impact of tropical theileriosis and the economic interest of vaccination with a live attenuated line. This evaluation was carried out on a total number of 56 calves and 12 adult cows in three farms in endemic stability state monitored during 2 summer season. Total cost due to different forms of *Theileria annulata* infection (clinical form, sub-clinical infection with and without anaemia) was estimated to 15115.058 Tunisian Dinars (9388.20 €). A major part of these losses (50.81%) is due to sub-clinical infections. Partial budgeting analysis lead to estimate the benefit-cost ratio of vaccination to 23.7. Sensitivity analysis showed that the decisional indifference point of the vaccine price is of 118 Tunisian Dinars (73.29 €).

The second part of this work consisted of two vaccination trials against tropical theileriosis with parasitic DNA using the prime-boost approach. The first trial was carried out with on total number of 20 calves randomised to one control group and 4 immunised animal groups. These calves were primed with recombinant DNA sequences of sporozoites (SPAG-1 antigen) or merozoite (Tams antigen) of *Theileria annulata* or both in a plasmid expression vector and boosted with either recombinant proteins (SPAG-1 group, Tams group, Tams/SPAG-1 Cocktail) or with a recombinant modified vaccinia virus Ankara (Tams/MVA group). All these calves groups exhibited partial protection against a lethal challenge. However, the highest level of protection level was observed in the cocktail SPAG-1/Tams and Tams Groups. The second trial was conducted on 17 calves randomised into 2 control groups (naked plasmid Group and non immunised Group) and a group of calves vaccinated with a cocktail of DNA of four schizont antigens (CL10, Tash AT3, Tash HN and PIM) and boosted by the corresponding recombinant vaccinia virus constructs of the modified strain Ankara. This trial did not result in the expression of indicators of post-vaccination immunity after exposure to a lethal challenge. Globally, these results show for the first time that the prime boost approach can induce a protective immune response against tropical theileriosis.

**Keywords:** Tropical theileriosis, Cattle, Tunisia, Vaccination, Cost-benefit analysis, prime-boost.