

Chlamydiose abortive et vaccination

A. SOURIAU, C. DE SA, A. RODOLAKIS (1)

(1) INRA, Station de Pathologie Infectieuse et Immunologie, 37380 Nouzilly

RÉSUMÉ – *Chlamydia psittaci* provoque chez les petits ruminants différentes pathologies. Les avortements sont les manifestations cliniques les plus fréquentes, les plus dangereuses pour la santé humaine, surtout pour les femmes enceintes, et celles dont les conséquences économiques sont les plus importantes. Le diagnostic est réalisé par bactérioscopie associée à un test sérologique. La transmission de la maladie a lieu essentiellement au moment de l'avortement, bien que la maladie se transmette également sexuellement. Les vaccins tués adjuvés permettent de limiter le nombre d'avortements, mais ne diminuent pas l'excrétion des chlamydia ni le niveau d'infection dans le troupeau. Leur utilisation systématique entraîne la sélection de variants contre lesquels le vaccin n'est plus efficace. Nous avons mis au point un vaccin vivant composé d'un mutant thermosensible. Ce vaccin prévient les avortements et l'excrétion des chlamydia. Un nouveau vaccin aussi efficace que le vaccin vivant mais permettant le dépistage des animaux infectés même dans les troupeaux vaccinés est à l'étude.

Chlamydial abortion and vaccination

A. SOURIAU, C. DE SA, A. RODOLAKIS (1)

(1) INRA, Station de Pathologie Infectieuse et Immunologie, 37380 Nouzilly

SUMMARY – *Chlamydia psittaci* induces several diseases in ruminants, among them abortions are the most common, the most important economically, and the most dangerous for human health, specially for pregnant women. Diagnosis is performed by microscopic examination of placental smears and serological analysis. The transmission of the disease occurred at the time of abortion when chlamydiae are discharged profusely in infected uterine fluids, placentas and fetuses. Venereal transmission is possibly a mode of infection. Killed vaccines reduced the incidence of abortions but could not prevent the excretion of chlamydiae. Systematic use of such vaccines could allow the selection of antigenic variants. We developed a live thermosensitive vaccine which is stable, safe and efficient since it prevents abortion and chlamydial shedding at lambing. A new vaccine as efficient as live vaccine and which allow the detection of infected animals, even in vaccinated flocks, is in progress.

INTRODUCTION

La chlamydie abortive est la principale cause d'avortements enzootiques ovins et caprins en France, en Grande-Bretagne et dans les pays du pourtour méditerranéen. Cette maladie est également responsable de pathologies qui réduisent la rentabilité des élevages (pneumonie, conjonctivite, arthrite, épидидymite...). Elle présente un risque pour la santé humaine : des femmes enceintes participant à l'agnelage se sont contaminées et ont avorté avec des complications sévères.

Lutter contre la chlamydie abortive, c'est diminuer les risques pour la santé humaine et améliorer la rentabilité des élevages.

1. LES CHLAMYDIA

La chlamydie est due à une bactérie à Gram négatif, à multiplication intracellulaire obligatoire, appartenant au genre *Chlamydia*. La taxonomie de ce genre bactérien est en cours de remaniement. Aujourd'hui, il est constitué de 4 espèces.

Deux espèces infectent préférentiellement l'homme :

* *C. trachomatis*, responsable

- du trachome, première cause de cécité infectieuse

- d'infections génitales sexuellement transmissibles (MST), entraînant des infertilités,

* *C. pneumoniae*, responsable d'infections respiratoires aiguës.

Les deux autres espèces infectent plus spécifiquement les animaux :

* *C. psittaci* constitue un groupe très hétérogène. Elle a été isolée chez de nombreux animaux domestiques ou sauvages et 13 sérotypes ont été identifiés. Elle infecte les oiseaux et les mammifères. Elle est responsable de zoonoses. Les souches du sérotype 1 provoquent des avortements chez les ruminants.

* *C. pecorum* constitue également un groupe hétérogène. Elle est responsable de pathologies diverses. Elle comprend des souches isolées de fèces d'animaux sans symptôme particulier dans des troupeaux sans problème d'avortement. Elle peut aussi être isolée de lésions pathologiques comme arthrites, conjonctivites, encéphalites, entérites, etc. Cette espèce comprend des souches du sérotype 2 de *C. psittaci* qui présentent moins de 20 % d'homologie d'ADN avec d'autres souches de *C. psittaci*.

De nouvelles espèces pourraient être créées après l'étude des homologies génomiques entre toutes les souches de sérotypes différents.

2. LA CHLAMYDIOSE DES PETITS RUMINANTS

2.1. LA MALADIE

L'avortement est la manifestation la plus grave car il y a perte d'agneaux et excrétion massive de chlamydia. Il se produit généralement dans le dernier mois de gestation, sans signe clinique précurseur. Les brebis se rétablissent rapidement alors que des complications sont plus fréquentes sur les chèvres. L'apparition de la maladie se traduit par des avortements massifs qui peuvent atteindre 30 % des animaux gestants dans un troupeau ovin et 70 % dans les troupeaux caprins. La maladie évolue de façon cyclique dans le troupeau avec une périodicité de 5 à 10 ans : pendant 2 ou 3 ans, les brebis avortent, ensuite le pourcentage d'avortements diminue, devient inférieur à 10 %, ce qui est acceptable pour l'éleveur, puis un nouvel épisode abortif se produit, principalement sur les primipares ou les femelles nouvellement intro-

duites dans le troupeau.

La maladie a des répercussions sur le taux de fertilité de l'élevage. Souvent, l'éleveur note un nombre de brebis non gestantes supérieur à la normale, parfois cette observation est un signe précurseur d'un épisode abortif.

2.2. LA TRANSMISSION

Le rôle central de l'avortement dans l'épidémiologie de la chlamydie est bien connu. L'importance de l'excrétion de la bactérie dans le placenta et les décharges utérines a été démontrée par Stamp dans les années 50. La contagion a lieu le plus souvent par voie oro-nasale. Le stade physiologique au moment de la contamination influence l'expression de la maladie :

- l'infection en tout début de gestation passe souvent inaperçue. Les morts fœtales de 4 brebis sur 19, inocuées à 50 jours de gestation, ont été détectées par ultrasons, 15 et 55 jours après l'infection, sans manifestation apparente (Papp et al, 1993).

- l'infection qui a lieu entre 60 et 100 jours de gestation provoque l'avortement.

- la contamination en fin de gestation entraîne le plus souvent la mise bas prématurée ou à terme d'agneaux chétifs, difficiles à élever, qui peuvent souffrir d'arthrite, de pneumonie ou de conjonctivite à chlamydia. Des chlamydia sont excrétées à la mise bas.

- l'infection des animaux non gravides évolue souvent vers une guérison avec protection mais dans 15 à 20 % des cas il y a avortement au cours de la gestation suivante.

Le rôle de la transmission vénérienne dans l'épidémiologie de la chlamydie des ruminants est un sujet de controverse :

- chez les humains *C. trachomatis* est transmise sexuellement.

- certaines brebis restent infectées après l'avortement et peuvent excréter de nouveau des chlamydia par voie vaginale en mettant bas des agneaux vivants et sains (Wilsmore et al, 1984). Cette excrétion peut également se produire après synchronisation des chaleurs au moment de l'ovulation, donc de la saillie, ce qui rend la transmission vénérienne possible (Papp et al, 1994).

- les béliers et les boucs s'infectent par saillie de femelles contaminées et excrètent des chlamydia dans le sperme.

Expérimentalement, la transmission sexuelle de *C. psittaci* par insémination artificielle avec de la semence dans laquelle des chlamydia ont été ajoutées se traduit par des retours en chaleurs par défaut de nidation de l'embryon (Bowen et al, 1978). L'inoculation intravaginale 6 semaines avant la saillie entraîne des naissances d'agneaux infectés, avec excrétion de chlamydia (Papp et Shewen, 1996) plutôt que des vagues d'avortements.

Les jeunes nés de mère infectée peuvent développer la maladie sans signe clinique précurseur. Les agnelles avortent et excrètent, les mâles ont des épидидymites avec excrétion de chlamydia dans le sperme (Rodolakis et Bernard, 1977). Ces jeunes sont d'autant plus dangereux du point de vue épidémiologique que leur taux d'anticorps reste généralement inférieur au seuil fixé pour le diagnostic de la chlamydie abortive.

Les transactions commerciales d'animaux infectés contribuent largement à la dissémination de la maladie et sont souvent à l'origine d'épisodes abortifs sévères. Le dépistage sérologique individuel n'est pas possible. Seul un diagnostic de troupeau réalisé dans le mois qui suit les mise-bas permet d'établir le risque vis-à-vis de la chlamydie.

3. LE DIAGNOSTIC

Le diagnostic est réalisé par bactérioscopie effectuée sur un frottis ou un calque de placenta, associée à l'analyse sérologique d'au moins une dizaine de sérums, par fixation du complément ou ELISA. Ces techniques manquent de sensibilité et de spécificité, elles ne différencient pas les animaux infectés par *C. psittaci* ou *C. pecorum*. Les techniques plus spécifiques, comme la mise en évidence des chlamydia directement dans les écouvillons vaginaux au moyen de kits commercialisés pour les infections humaines, sont onéreuses. L'isolement des chlamydia et la PCR restent actuellement du domaine de la recherche ou des laboratoires très spécialisés. La recherche d'antigènes spécifiques de la chlamydie abortive, utilisables pour le diagnostic sérologique, améliorerait considérablement ce diagnostic. Un antigène de diagnostic, spécifique des souches abortives, induisant une réponse sérologique précoce et intense a été identifié (Souriau et al, 1994). Sa production sous forme d'antigène recombinant est actuellement en cours dans notre laboratoire.

4. LA VACCINATION

4.1. LES VACCINS TUÉS ET ADJUVÉS

Rapidement, après l'identification de *C. psittaci* en tant qu'agent de l'avortement enzootique ovin (Stamp et al, 1950), un vaccin composé de chlamydia tuées et adjuvées (McEwen et al, 1955) a été développé et utilisé de façon systématique. Cependant, dans les années 1970, des échecs de vaccination de plus en plus fréquents sont apparus. Des souches isolées d'échec de vaccination ont alors été ajoutées à la souche vaccinale. Les résultats de ces nouveaux vaccins ont été décevants (Linklater et al, 1987), et l'incidence de la maladie a augmenté régulièrement.

4.2. LE CONTRÔLE DES VACCINS

Les vaccins inactivés commercialisés contre la chlamydie abortive sont contrôlés de manière empirique par le taux d'anticorps fixant le complément qu'ils induisent après injection au Lapin. Ces anticorps sont dirigés contre les antigènes portés par le lipopolysaccharide (LPS). Ils ne sont ni neutralisants ni protecteurs et ne permettent pas de prévoir l'efficacité du vaccin.

Par injection de *C. psittaci* à mi-gestation, il est possible de reproduire la maladie chez la Souris, avec infection placentaire et fœtale. Le niveau de l'infection peut être suivi par la recherche des chlamydia directement dans les tissus ou simplement par le dénombrement des souriceaux vivants, 8 jours après la naissance (Rodolakis et al, 1981). La comparaison du nombre de petits vivants dans un groupe de souris vaccinées et éprouvées à celui des souris témoins inoculées et non inoculées permet d'évaluer le niveau de protection du vaccin. Dans ce modèle, l'efficacité de différents lots de vaccins commerciaux a été très variable : certains n'ont pas eu plus d'effet que l'adjuvant seul et d'autres ont permis des gestations presque normales. La quantité de corps bactériens présents dans la dose vaccinale et la qualité de l'inactivation sont essentielles. Pour protéger la Souris contre l'avortement et la colonisation placentaire, il faut un nombre important de corps bactériens (10^7 chlamydia par souris), incompatible avec le prix d'un vaccin ovin.

5. LE VACCIN VIVANT THERMOSENSIBLE 1B

5.1. SÉLECTION (RODOLAKIS, 1983)

L'immunité acquise dans une infection naturelle permet de prévenir l'avortement et l'excrétion lors des mise-bas sui-

vantes. Un vaccin vivant devrait permettre d'obtenir une immunité semblable.

Deux mutants thermosensibles (mutants *ts*) de la souche AB⁷ ont été obtenus après traitement par un agent mutagène, la nitrosoguanidine. Ils se multiplient normalement à la température permissive de 38°C mais de façon très réduite à la température restrictive de 39,5°C, température corporelle normale des brebis et des chèvres. Ils ont une virulence atténuée pour la Brebis et la Chèvre. Ils ont également une virulence atténuée pour la Souris, ce qui indique que l'atténuation de la virulence n'est pas seulement liée à la thermosensibilité. En effet, la température corporelle de la Souris, 38°C, est la température permissive des mutants *ts*.

La souche 1B, stable après passage sur souris, gestantes ou non, a été choisie comme souche vaccinale potentielle.

5.2. PROTECTION DE LA SOURIS PAR LE VACCIN VIVANT 1B

Des souris (OF1 Swiss IFFA Credo 61210, France) ont été vaccinées par voie sous-cutanée dorsale avec environ 2×10^5 chlamydia vivantes, deux mois avant l'épreuve virulente (Rodolakis et Bernard, 1984) avec la souche vaccinale thermosensible 1B et 2 souches isolées d'avortements dans des troupeaux écossais vaccinés (souche S26/3), ou non vaccinés (souche H574). La souche H574 ne protège pas contre une infection par S26/3, alors que la souche 1B protège efficacement contre les deux souches. Ces résultats valident le modèle expérimental murin. En effet, les résultats obtenus ont confirmé ceux observés expérimentalement sur des agnelles (Aitken et al, 1986).

5.3. INNOCUITÉ SUR AGNELLES ET CHEVRETTES (RODOLAKIS ET SOURIAU, 1986 ; RODOLAKIS ET AL 1989)

Vaccinées à l'âge de 6-8 mois, avec 4×10^6 chlamydia vivantes en ID, au moins 2 mois avant la saillie, 123 agnelles ont présenté 3 jours plus tard une élévation de température de 0,5 à 1,5°C. Les réactions locales ont été très faibles. La fertilité des agnelles n'a pas été affectée par la vaccination, la durée de gestation et la moyenne du poids des agneaux n'ont pas différé de celles des lots contrôles pour les 91 mise-bas observées. Cependant, 2 brebis ont excrété quelques chlamydia et l'isolement de la souche a été possible dans un cas ; elle avait les caractéristiques du vaccin 1B.

Ces vaccinations, effectuées dans une bergerie protégée puis dans le troupeau conventionnel n'ont entraîné aucune excrétion et aucune séroconversion des animaux « contacts ».

Dans les mêmes conditions, 31/45 chevrettes ont été vaccinées. Trente chevrettes vaccinées et 15 chevrettes « contacts » ont mis bas sans excrétion avec des performances identiques à l'élevage traditionnel.

5.4. RÉPONSE SÉROLOGIQUE APRÈS VACCINATION

La vaccination a entraîné une élévation du titre en anticorps fixant le complément. La valeur maximale, comprise entre 1/80 et 1/320, a été atteinte en 3 à 5 semaines, puis a décliné pour devenir, au bout de six mois, inférieure au 1/80 pour l'ensemble des animaux. Après les mise-bas, aucune élévation significative du titre en anticorps fixant le complément n'a été constatée sur les animaux vaccinés et sur les animaux « contacts ».

5.5. IMMUNITÉ DES BREBIS ET CHÈVRES VACCINÉES

Les agnelles ont été inoculées avec la souche AB⁷, à 78 jours de leur seconde gestation (Rodolakis et Souriau, 1983). Aucune des 16 brebis vaccinées n'a excrété de chlamydia à la mise bas. La durée de gestation et les performances des agneaux ont été identiques à celles des brebis de la bergerie

conventionnelle, alors que la dose d'épreuve a provoqué 4 avortements et l'excrétion de 9/10 brebis dans le lot témoin non vacciné.

Les chevrettes ont été éprouvées avec une souche sauvage, AC1, isolée d'un avortement caprin (Rodolakis et Souriau, 1986). Les performances des animaux vaccinés sont conformes à celles de l'élevage conventionnel. Dans le lot témoin non vacciné, 13/14 chèvres ont excrété des chlamydia, contre 1/24 chèvres vaccinées. La chèvre vaccinée qui a excrété à la mise-bas était fiévreuse, au moment de la vaccination, ce qui peut expliquer cet échec partiel de vaccination.

6. VACCINS VIVANTS ASSOCIÉS, BRUCELLOSE, CHLAMYDIOSE, SALMONELLOSE

Les avortements sporadiques sont fréquemment d'origine infectieuse, et sont le plus souvent dus à la brucellose, la chlamydie, la salmonellose, la toxoplasmose ou la fièvre Q. L'association du vaccin 1B aux vaccins vivants commerciaux contre la brucellose (Rev1) et la salmonellose (Rv6) permettrait de réduire l'incidence de 3 maladies en une seule intervention.

Dans le modèle expérimental murin, l'efficacité des vaccins salmonellose et brucellose n'est pas affectée par l'association des 3 valences (Plommet et al, 1987). En revanche, l'efficacité du vaccin chlamydie est diminuée de 15 à 20 % quand il est associé avec le vaccin brucellose.

L'immunité conférée par le mélange, dans la même seringue, des 3 vaccins a donc été testée sur des agnelles et comparée à celle du vaccin 1B seul (Souriau et al, 1988). L'injection du vaccin trivalent n'a pas perturbé la première gestation. Au cours de la seconde gestation, les animaux gestants ont été éprouvés par voie sous-cutanée, avec la souche AB⁷. Dans le lot témoin non vacciné, 10/12 brebis excrètent à la mise bas contre 3/12 avec le vaccin 1B seul et 0/17 pour le vaccin associé 1B-Rev1-Rv6. La vaccination triple ne diminue donc pas l'immunité des brebis vis-à-vis de la chlamydie.

7. VACCINATION AVEC LE VACCIN VIVANT 1B DANS LES CONDITIONS NATURELLES

En 10 ans, plus de 15 000 doses vaccinales ont été injectées dans 4 troupeaux ovins et 2 troupeaux caprins. Aucun élément négatif n'a été rapporté et l'incidence des avortements est devenue inférieure à 2 %. Cependant, 5 ans après les premières vaccinations, une recrudescence d'avortements est apparue dans l'un d'entre eux, mais elle était due à la fièvre Q, et la souche de *Coxiella burnetii* a été isolée.

Depuis 1993, le vaccin vivant INRA est vendu en Grande-Bretagne et plus d'un million de doses ont été distribuées (Enzovax, Intervet). En France, le dossier d'A.M.M. (Autorisation de Mise sur le Marché) est en cours. Il semble raisonnable d'espérer sa commercialisation pour l'automne 96 (Tevax chlamydia, Vétoquinol).

8. PERSPECTIVES

A l'Inra, nous cherchons à mettre au point un nouveau vaccin. Pour être intéressant, ce vaccin devra être aussi efficace que le vaccin vivant 1B, avoir un coût de production acceptable et donner une réponse sérologique différente des animaux infectés, ce qui n'est pas possible actuellement. Pour cela, il est nécessaire d'identifier les sous-unités de la bactérie capables d'induire une protection (antigènes protecteurs) et de trouver des antigènes (antigènes de diagnostic), différents des antigènes protecteurs, donnant une réponse anticorps forte et précoce dans les infections naturelles. Alors,

l'interprétation des résultats sérologiques devrait être simplifiée :

- le sérum de l'animal reconnaît l'antigène de diagnostic ; l'animal est ou a été infecté naturellement,

- le sérum de l'animal ne reconnaît pas l'antigène de diagnostic ; l'animal est indemne ou vacciné. Dans un second temps, la recherche des anticorps vaccinaux permettra aussi, si on le souhaite, de différencier ces deux groupes d'animaux.

8.1. ANTIGÈNES DE DIAGNOSTIC (SOURIAU ET AL, 1994)

L'étude de l'action de sérums de brebis infectées sur des antigènes de chlamydia a permis d'identifier une protéine de diagnostic. Le gène de la protéine a été cloné et sa production par des bactéries recombinantes est en cours. L'intérêt de cette protéine dans le diagnostic de la chlamydie devra être évalué sur le terrain et les modalités d'utilisation et d'interprétation définies.

8.2. ANTIGÈNES PROTECTEURS (DE SA ET AL, 1995)

Nous avons sélectionné des anticorps monoclonaux capables de neutraliser l'infection *in vitro*. Ensuite, leur pouvoir neutralisant *in vivo* a été testé par transfert passif à la Souris, 24 h avant l'épreuve avec la souche abortive. Les anticorps monoclonaux protecteurs testés sont spécifiques des souches de *C. psittaci* du sérotype 1. Ils sont dirigés contre des épitopes dénaturés par la chaleur, donc vraisemblablement conformationnels, localisés sur un oligomère de la protéine majeure de la membrane externe (MOMP) de *C. psittaci*. Cette protéine représente 60 % de la membrane externe de la bactérie. Les souris vaccinées avec l'oligomère de la MOMP partiellement purifié, seul ou adjuvé par du LPS de *Salmonella Minnesota Re*, sont protégées contre l'avortement, et l'infection placentaire est considérablement réduite. Ces résultats montrent qu'une concentration adéquate en oligomère devrait permettre d'obtenir une immunité supprimant l'excrétion à la mise bas.

Des essais de vaccination sur brebis avec des fractions subcellulaires contenant de la MOMP (2 x 16 µg en matrice d'IS-COM) avaient été décevants car 22/63 brebis vaccinées avaient présenté de grosses lésions placentaires et 3 avaient avorté (Jones et al, 1995). Cependant, la présence des épitopes protecteurs, inconnus de ces auteurs, n'avait pas été contrôlée dans ces préparations alors qu'ils sont très fragiles. Ceci souligne l'importance du contrôle des vaccins.

Pour être compatible avec les contraintes économiques des élevages ovins et caprins, ce vaccin « nouvelle génération » ne pourra être préparé à partir des chlamydia. De nouvelles technologies (vaccin recombinant, anticorps anti-idiotypes, peptides produits par des phages filamenteux, ...) devront être explorées pour diminuer son prix de revient.

Un vaccin efficace, prévenant l'avortement et l'excrétion des chlamydia à la mise-bas, associé à un diagnostic spécifique de la chlamydie abortive, devrait permettre de contrôler cette maladie et de réduire les risques qu'elle entraîne pour la santé humaine. Leur mise au point est un des objectifs de l'équipe chlamydie de l'INRA de Nouzilly, avec l'identification de marqueurs moléculaires des souches, indispensable pour améliorer les connaissances sur l'épidémiologie de la maladie.

(Bibliographie disponible auprès des auteurs.)