

Résultats de la vaccination contre la leishmaniose canine (*Leishmania infantum*) en zone d'enzootie

Results of vaccination against canine visceral leishmaniasis (Leishmania infantum) in enzootic areas

Par Christophe HUGNET⁽¹⁾, Jean-Loup LEMESRE⁽²⁾,
Gérard PAPIEROK⁽³⁾ et Gilles BOURDOISEAU⁽⁴⁾
(communication présentée le 2 février 2006)

RÉSUMÉ

La protection contre la leishmaniose canine est évaluée chez des chiens vivant en zone d'enzootie dans le sud de la France, vaccinés par un candidat LiESP adjuvé par MDP. Une étude de terrain randomisée en double aveugle est conduite dans une large population de chiens ($n = 414$), durant une période de deux années. À l'issue de l'étude, le taux d'infection est de 0 % chez les chiens vaccinés et de 5,14 % chez les chiens du groupe placebo. Le candidat vaccinal a induit une immunité efficace, durable contre la leishmaniose canine.

Mots-clés : *Leishmania infantum*, chien, vaccin.

SUMMARY

Protection against canine leishmaniasis was evaluated in dogs living in enzootic areas in the south of France, and vaccinated with a candidate vaccine, LiESP with the adjuvant MDP. A double-blind field study was carried out in a large number of dogs ($n = 414$) over two years. At the end of the study, infection rate was 0% in vaccinated dogs versus 5.14% in the placebo group. The candidate vaccine induced an effective and lasting immunity against canine leishmaniasis.

Keys words: *Leishmania infantum*, dog, vaccine.

(1) Clinique Vétérinaire des Lavandes, La-Bégude-de-Mazenc.

(2) Unité de pathogénie des trypanosomatidés, Institut de Recherche pour le Développement, Montpellier.

(3) Laboratoire BioVétoTest, La-Seyne-sur-Mer.

(4) Unité de Parasitologie - Mycologie - Maladies parasitaires, École Nationale Vétérinaire de Lyon.

• INTRODUCTION

La leishmaniose canine due à *Leishmania infantum* constitue une préoccupation majeure des propriétaires et des praticiens du pourtour méditerranéen. En effet, aucun traitement ne permet pour l'instant d'obtenir une guérison complète sans risque de rechute. De même, les mesures prophylactiques reposant tant sur des mesures hygiéniques (éviter les sorties des chiens durant les périodes d'activité des phlébotomes vecteurs de la leishmaniose) que médicales (dispositifs rémanents à base de pyréthroides tels que les colliers ou les spots, appliqués sur les chiens) n'empêchent pas de nouvelles contaminations en zone d'enzootie. Le développement d'un vaccin efficace peut permettre de diminuer non seulement l'incidence de la leishmaniose canine mais aussi de limiter les risques de contamination humaine en zone d'enzootie, par la maîtrise des foyers canins.

Un candidat vaccinal (LiESP) dont l'efficacité a été préalablement évaluée en condition expérimentale chez des chiens beagle, en laboratoire (LEMESRE *et al.*, 2005), fait l'objet d'une étude sur le terrain, randomisée en double aveugle, durant deux saisons d'activité des phlébotomes en zone d'enzootie leishmanienne.

Ces travaux sont le fruit d'une étroite collaboration entre l'unité de pathogénie des trypanosomatidés (Institut de Recherche pour le Développement, IRD), le laboratoire Bio Vétro Test (BVT), l'Unité de Parasitologie de l'École Vétérinaire de Lyon et 18 cabinets ou cliniques vétérinaires répartis dans la zone d'enzootie de la leishmaniose canine à la fois sur les territoires d'activité de *Phlebotomus ariasi* (Languedoc) et de *Phlebotomus perniciosus* (Provence, Côte d'Azur) (figure 1).

• MATÉRIELS ET MÉTHODES

Candidat vaccinal LiESP

Le candidat vaccin LiESP est composé de 100 mg de protéines lyophilisées (Excreted Secreted Proteins, ESP) associées à 200 mg d'un adjuvant, le MDP, (le muramyl dipeptide, un dérivé de l'adjuvant complet de Freund) et mises en solution (1 ml de NaCl à 0,9 %) avant injection par la voie sous-cutanée (Brevet BVT PCT/FR02/01823). Les ESP sont des antigènes excrétés et sécrétés par des promastigotes

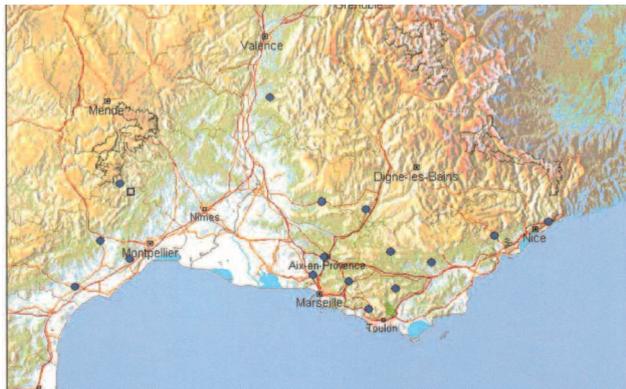


Figure 1 : Localisation des 18 cabinets ou cliniques vétérinaires participant à l'étude.

(souche MHOM/MA/67/ITMAP-263) en cultures axéniques et asériques (brevet IRD PCT 941005771).

Population étudiée

Initialement, 771 chiens vivant à l'extérieur (chiens de chasse, chiens de garde, chiens de berger...) en zone d'enzootie, d'âge et de race variables, ont subi des prélèvements. En raison de suspicion clinique, de sérologie positive (par technique d'immunofluorescence indirecte) ou de culture positive à partir d'un prélèvement de moelle osseuse, 357 chiens sont rejetés de l'étude. Deux groupes sont constitués après randomisation à partir des 414 chiens retenus : 205 chiens dans le groupe vaccin et 209 chiens dans le groupe placebo. À la suite de la mort de chiens par accident de chasse pour la plupart, ou de leur perte par défaut de présentation, l'étude porte finalement sur 340 chiens : 165 chiens sont vaccinés et 175 chiens reçoivent le placebo.

Ces chiens vivent dans leurs conditions habituelles : ils ne font l'objet d'aucun transfert et sont restés dans leur chenil respectif, y compris les chiens appartenant à des meutes ou chenils présentant des chiens leishmaniens.

Aucun traitement antiparasitaire externe contre les phlébotomes (à base de pyréthroides par exemple) n'est autorisé durant les deux saisons d'étude.

Protocole

En mai 2000, tous les chiens reçoivent une première injection vaccinale (ou de placebo) par la voie sous-cutanée, suivie d'une seconde injection un mois plus tard. En mai 2001, des injections de rappel sont effectuées.

Les suivis clinique et biologique sont réalisés conjointement par les vétérinaires investigateurs et les laboratoires de recherche de l'IRD et de BVT ; les vétérinaires investigateurs réalisent les examens cliniques et les prélèvements biologiques (sang, moelle osseuse) ainsi que la conservation de ceux-ci avant leur acheminement, suivant le protocole prévu.

Critères de suivi

Le statut leishmanien, la charge parasitaire (par technique d'amplification génétique, PCR), ainsi que la réponse immunitaire de type Th1 par le dosage des IgG2 spécifiques (brevet BVT PCT/FR03/02358) sont déterminés chez tous les chiens durant et après les deux saisons d'activité des phlébotomes (de mai 2000 à novembre 2001).

Le statut leishmanien a été établi sur deux critères : la suspicion clinique de leishmaniose (et/ou une sérologie par immunofluorescence indirecte $\geq 1/200$) (critère A) et la culture positive de *Leishmania* sur milieu NNN (Novy, Nicolle, Mac Neal) à partir d'un prélèvement de moelle osseuse (critère B).

Certains chiens font en plus l'objet d'études approfondies de leur réponse immunitaire anti-leishmanienne en évaluant la cinétique des IgG2 au cours des deux années et l'activité leishmanicide des monocytes activés ; celle-ci est exprimée par un pourcentage d'inhibition de l'index

Chiens	Vaccinés (V) Placebo (P)	Critère A		Critère B	"Statut leishmanien"
		Manifestations cliniques de présomption	Résultat de la sérologie IF (+ $\geq 1/200$)	Culture sur milieu NNN	
PGC 072	V	-	1/400	-	NON
DM 002	V	-	1/200	-	NON
LM 009	V	-	1/200	-	NON
PMP 010	V	-	1/200	-	NON
SJP 100	V	-	1/200	-	NON
HC 048	V	-	1/200	-	NON
PMP 022	V	+	-	-	NON
GJ 008	V	+	-	-	NON
GJ 052	V	+	-	-	NON

Tableau 1 : Chiens du groupe vacciné répondant uniquement au critère A.

parasitaire dans un milieu de culture contenant des macrophages et des lymphocytes autologues infectés par des promastigotes (HOLZMULLER *et al.*, 2005).

• RÉSULTATS

Dans le groupe vacciné, neuf chiens ont répondu au seul critère A. Trois présentaient des signes cliniques de présomption de leishmaniose canine avec une sérologie négative. L'identification d'une autre cause responsable des lésions et symptômes observés a systématiquement été possible. Les six autres ont présenté une légère positivité de leur sérologie en fin d'étude, sans manifestation clinique de présomption (tableau 1).

On peut donc conclure qu'au terme des deux saisons d'activité des phlébotomes, aucun chien du groupe vacciné n'a présenté un statut leishmanien, tandis que 9 chiens parmi les 175 du groupe placebo, soit 5,14 %, ont satisfait aux critères de ce statut (tableau 2). La différence observée peut être considérée comme significative (p = 0,0036).

En évaluant le taux d'IgG2 spécifiques (reflet d'une réponse de type Th1), on a constaté que 100 % des chiens vaccinés devenaient positifs versus 2,3 % des chiens du groupe placebo. La différence est très significative (p < 0,0001).

L'étude de la cinétique des IgG2 conduite chez 22 chiens du groupe vacciné a montré la décroissance du taux d'IgG2 entre 6 mois et un an après la vaccination, conduisant à la nécessité d'une injection de rappel annuel pour assurer une réponse de type Th1 efficace et durable.

Chiens	Critère A		Critère B	"Statut leishmanien"	Phlebotomus
	Manifestations cliniques de présomption	Résultat de la sérologie IF (+ $\geq 1/200$)	Culture sur milieu NNN		
HB 027	+	1/12800	+	OUI	<i>P. ariasi</i>
DM 007	+	1/3200	+	OUI	<i>P. perniciosus</i>
MJ 014	-	1/3200	+	OUI	<i>P. perniciosus</i>
PMP 004	+	1/3200	+	OUI	<i>P. ariasi</i>
SJP 030	-	1/1600	+	OUI	<i>P. ariasi</i>
RR 015	+	1/800	+	OUI	<i>P. perniciosus</i>
SJP 118	+	1/400	+	OUI	<i>P. ariasi</i>
LB 120	-	1/400	+	OUI	<i>P. perniciosus</i>
PGC 030	-	1/200	+	OUI	<i>P. perniciosus</i>
SJP 046	-	1/400	Inconnu *	?	<i>P. ariasi</i>

Tableau 2 : Chiens présentant un statut leishmanien dans le groupe placebo. (* : refus de la ponction médullaire par le propriétaire).

Les résultats de l'activité leishmanicide des macrophages prélevés sur 19 chiens du groupe placebo et 15 chiens du groupe vacciné mettent en évidence une différence importante entre les deux groupes :

- 5,32 % d'activité leishmanicide (avec un écart type de 6,77) pour le groupe placebo,
- 58,44 % d'activité leishmanicide (avec un écart type de 14,85) pour le groupe vacciné.

L'efficacité observée du vaccin LiESP est indépendante du phlébotome vecteur de la leishmaniose canine.

• DISCUSSION

Les résultats obtenus dans cette étude de terrain permettent de conclure à l'efficacité du candidat vaccinal LiESP pour induire une immunité protectrice en zone d'enzootie chez des chiens de propriétaires. Cette efficacité est indépendante du vecteur (*P. ariasi*, *P. perniciosus*).

Antérieurement, ce candidat vaccinal LiESP avait également révélé son intérêt en immunothérapie chez des chiens atteints de leishmaniose (BOURDOISEAU *et al.*, 2004).

L'ensemble de ces données obtenues chez le chien apporte de grands espoirs quant à la prévention de la leishmaniose humaine via le support de protéines de type ESP spécifiques.

BIBLIOGRAPHIE

• BOURDOISEAU G, HUGNET C, PAPIEROK G, LEMESRE JL (2004) Leishmaniose canine à *Leishmania infantum* : essais d'immunothérapie. *Bull. Acad. Vét. France*, **157** (1), 63-67.

• HOLZMULLER P, CAVALEYRA M, MOREAUX J, KOVACIC R, VINCENDEAU P, PAPIEROK G (2005) Lymphocytes of dogs immunised with purified excreted-secreted antigens of *Leishmania infantum* co-incubated with *Leishmania* infected macrophages produce IFN gamma resulting in nitric oxide-mediated amastigote apoptosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **106** (3-4), 247-257.

• LEMESRE JL, HOLZMULLER P, CAVALEYRA M., GONCALVES RB, HOTTIN G, PAPIEROK G (2005) Protection against experimental visceral leishmaniasis infection in dogs immunized with purified excreted secreted antigens of *Leishmania infantum* promastigotes. *Vaccine*, **23** (22), 2825-2840.