

## ETUDE DE LA RESISTANCE ACQUISE PAR LA LAPINE REPRODUCTRICE IMMUNISEE AVEC UNE LIGNEE PRECOCE d'*Eimeria magna* ET DE SA TRANSMISSION A SA PORTEE.

DROUET-VIARD F., COUDERT P., ROUX C., LICOIS D., BOIVIN M.

I.N.R.A, Station de Pathologie Aviaire et Parasitologie, F-37380 NOUZILLY - France

**RESUME:** Cinquante deux lapines exemptes de coccidies ont été utilisées pour cet essai, dont 26 immunisées per os au moyen d'inoculations répétées de  $10^4$  oocystes de la souche précoce d'*Eimeria magna* pendant la gestation. Après la troisième inoculation, l'excrétion d'oocystes a été indécélable, et aucun signe de maladie n'a été observé. Les anticorps sériques (Ac) ont été titrés par une technique ELISA. Chez les témoins, les titres en Ac restaient au-dessous d'une densité optique de 0,25 à la longueur d'onde de 405nm. Chez les mères immunisées, le niveau des Ac s'élevait 4 semaines après la première inoculation. Les inoculations de rappel faites 7 et 4 jours avant la mise-bas ont provoqué une élévation importante du titre en Ac. 26 femelles ont reçu une injection d'extraits de sporozoïtes 2 et 17 jours après la mise-bas; ces injections ont provoqué une très forte élévation du titre en Ac

par rapport à celui des femelles non traitées. Les Ac sériques des lapereaux au sevrage ont été titrés à 29 et 39 jours. Dans tous les groupes, les titres en Ac étaient très bas, mais nous avons observé un titre légèrement plus élevé dans les groupes correspondant aux mères immunisées. L'augmentation du titre en Ac chez les mères traitées avec des extraits de sporozoïtes n'a pas eu d'effet sur les titres en Ac de leurs portées. Pour évaluer l'immunité transmise par les mères, les lapereaux ont été inoculés avec  $10^5$  oocystes de la souche précoce d'*Eimeria magna*, et l'excrétion d'oocystes a été mesurée. L'excrétion totale a été identique ( $6 \times 10^4$  oocystes) dans tous les groupes, et la perte de gain de poids a été la même que celle des témoins inoculés. Nous pouvons conclure que l'immunité maternelle n'a pas protégé la portée contre une infection à *E. magna*.

**SUMMARY.** Study of the resistance acquired by rabbit does immunized with a precocious line of *Eimeria magna* and of its transmission to their litters.

Fifty two coccidia free rabbit does were used in this experiment and 26 of them were immunized by repeated per os inoculations of  $10^4$  oocysts of *Eimeria magna* precocious line during gestation. The oocyst output was completely controlled after the third inoculation and signs of disease were never observed. The serum antibodies (Ab) were titrated by an ELISA method. In the controls, the Ab titers were constantly below the optical density 0.25 at the wave length 405nm. In immunized does, the Ab level began to increase 4 weeks after the first inoculation. Booster inoculations given 7 and 4 days before parturition produced a high increase of Ab level. 26 females received an injection of sporozoites extracts 2 and 17 days after

parturition; these injections produced a dramatic increase of the Ab level compared with that of the untreated females. The serum Ab of the weanlings were titrated at 29 and 39 days of age. In all groups, the Ab titers were very low but a slightly higher level was observed in the groups corresponding to the immunized does. The dramatic increase of the Ab titers of the does injected with sporozoites had no effect on the Ab titers of their litters. To test the protection transmitted by the mothers, the weanlings were inoculated with  $10^5$  oocysts of the same *Eimeria magna* precocious line and the oocyst output was measured. The whole excretion of oocysts was identical ( $6 \times 10^4$  oocysts) in all groups, and the decrease in weight gain was identical to that of inoculated controls. We can conclude that the does' immunity did not protect the litter against an infection with *E. magna*.

### INTRODUCTION

L'évolution du taux d'anticorps après infection avec des parasites du genre *Eimeria* a été étudiée chez de nombreuses espèces. Chez les mammifères, des travaux effectués chez le rat (ROSE *et al.* 1984), chez les bovins (SAATARA *et al.* 1986; HUGHES *et al.* 1989), chez le mouton (NOLAN *et al.* 1986; CATCHPOLE *et al.* 1993) montrent qu'une réponse humorale à l'infection existe mais qu'elle présente de grandes variations entre animaux. En outre, NOLAN *et al.* (1986), FIEGE *et al.* (1992) ont montré chez l'agneau et le veau la transmission des anticorps maternels dirigés contre le parasite via le colostrum. Chez le lapin, la réponse humorale lors d'une infection avec des coccidies est très mal connue. COUDERT *et al.* (1978) ont montré, chez le lapereau sevré, une augmentation importante du taux de globulines sériques 14 jours après inoculation. Dans ce travail nous avons voulu évaluer la transmission de l'immunité maternelle au lapereau d'une part en suivant à l'aide d'une technique de dosage immunoenzymatique spécifique l'évolution du taux d'anticorps circulants au cours de la gestation et de la lactation de lapines immunisées ou non, d'autre part apprécier après une inoculation d'épreuve, l'intensité de la maladie (baisse du gain de poids) et l'excrétion d'oocystes chez les lapereaux.

### MATERIELS ET METHODES.

#### Animaux.

Les lapines nullipares âgées de 4 mois, naïves et indemnes de coccidies, provenaient de l'élevage EOPS de notre laboratoire. Elles étaient hébergées en cages individuelles dans le même local déjà décrit par VIARD-DROUET *et al.* (1983). Toutes les précautions étaient prises pour éviter une contamination des lots témoins: changement de blouse et de gants avant chaque manipulation d'un nouveau lot.

#### Matériel parasitaire.

Les souches de coccidies utilisées étaient fraîchement préparées; nous avons utilisé la lignée précoce d'*Eimeria magna* (PrEmag 1992-29) produite dans notre laboratoire selon la méthode décrite par LICOIS *et al.* (1988,1995).

#### Protocole expérimental

Ce protocole est schématisé dans le tableau 1.

#### Expérimentation sur les femelles

Un suivi sérologique a été effectué sur deux séries de femelles inséminées à 15 jours d'intervalle, comprenant

**Tableau 1 : Schéma de répartition des femelles et des lapereaux dans les lots expérimentaux.**  
Chaque lot comportait 13 femelles âgées de 4 mois. A la naissance 4 lapereaux de chaque portée ont été adoptés par une femelle d'un autre lot, les 4 autres petits restant avec leur mère.

Lots	FEMELLES			LAPEREAUX
	Première immunisation avec $10^3$ oocystes de PrEmag avant l'insémination	4 inoculations de $10^4$ oocystes de PrEmag pendant la gestation	2 injections d'extraits de sporozoïtes pendant la lactation	Lots (A) adoptés à la naissance (O) allaités par leur propre mère
TS-	non	non	non	TOS- TAS-
TS+	non	non	oui	TOS+ TAS+
IS-	oui	oui	non	IOS- UAS-
IS+	oui	oui	oui	IOS+ IAS+

chacune 26 lapines réparties en quatre groupes de la façon suivante:

- Les femelles désignées par "I", ont été immunisées par inoculation *per os* d'oocystes d'*E. magna* précoce avant et pendant la gestation. La première inoculation faite avec une dose faible ( $10^3$  oocystes) a été suivie de quatre rappels ( $10^4$  oocystes) 7, 17, 38, et 40 jours après la première inoculation (première série de lapines), 13, 38, 59 et 61 jours après la première inoculation (deuxième série de lapines).

- Les femelles désignées par "T", sont les lapines témoins non immunisées c'est à dire non contaminées et recevant un aliment supplémenté en anticoccidien (66 ppm de robenidine).

- Pour augmenter le titre en anticorps circulants pendant la lactation, 2 et 17 jours après la mise bas, dans chacun des groupes I et T, la moitié des femelles a subi des injections intramusculaires d'extraits de sporozoïtes d'*E. magna*. La quantité d'extraits de sporozoïtes injectée à chaque femelle provenait du traitement d'environ  $8 \times 10^6$  sporozoïtes, la préparation de ces extraits étant décrite plus loin.

Les échantillons de sang, prélevés dans la veine centrale de l'oreille, ont été collectés périodiquement au cours de la gestation et de la lactation. Le sérum était prélevé et conservé à  $-20^\circ\text{C}$ . L'analyse a porté sur 20 femelles dans la première expérimentation et 15 dans la seconde.

#### *Expérimentation sur les lapereaux*

Pour évaluer une éventuelle transmission transplacentaire de l'immunité, dans chaque portée la moitié de l'effectif a été adopté à la naissance par une femelle ayant subi le traitement opposé: la moitié des lapereaux des lapines I ont été adoptés par les lapines T et réciproquement (Tableau 1).

Pour tester l'immunité transmise par la mère, 4 jours après le sevrage, tous les lapereaux ont été inoculés avec  $10^5$  oocystes d'*E. magna*. Les animaux ont été pesés le jour du sevrage (30 jours), le jour de l'inoculation (34 jours) puis 3, 7, 14 et 17 jours après l'inoculation.

Une étude sérologique a été effectuée sur deux séries de prélèvements de sang, collectés à 11 jours d'intervalle, sur 16

lapereaux. Le premier prélèvement a eu lieu le jour du sevrage et le second 7 jours après l'inoculation.

#### **Dosage des anticorps .**

Le dosage a été réalisé avec une technique ELISA adaptée des techniques utilisées par GILBERT *et al.* (1988) et ONAGA *et al.* (1989). L'antigène utilisé était un extrait de sporozoïtes, préparé de la façon suivante: une suspension de sporozoïtes, obtenue après excystation, était exposée aux ultrasons, pendant 30 à 60 secondes, ce qui entraînait la désintégration des cellules. Après centrifugation à 2500 g, le surnageant était filtré ( $0,8 \mu\text{m}$ ) et sa concentration en protéines dosée par la méthode au BCA (acide bicinchoninique; kit commercialisé par Pierce). Les échantillons de sérum étaient dilués au 1/50 dans du tampon PBS contenant 1 % de lait écrémé. 50  $\mu\text{l}$  d'extraits d'*E. magna* à une concentration de 10  $\mu\text{g/ml}$  de PBS étaient adsorbés dans chaque puits de plaques à microtitration (Greiner). Les plaques étaient séchées la nuit à  $37^\circ\text{C}$  puis conservées à  $-20^\circ\text{C}$  jusqu'au dosage. Les sites de liaison non spécifiques étaient saturés avec 100  $\mu\text{l}$  de tampon PBS-lait 1%, la nuit à  $+4^\circ\text{C}$ . Les plaques étaient lavées 3 fois avec du PBS-Tween 20 à 0,05 %, puis 100  $\mu\text{l}$  de sérum dilué au 1/50 dans du PBS-lait 1 % étaient déposés dans chaque puits et incubés avec les antigènes pendant une heure à  $37^\circ\text{C}$ . Les plaques étaient lavées 4 fois avec du PBS-Tween 20 à 0,05 % puis, 100  $\mu\text{l}$  d'anticorps anti-IgG de lapin produit chez la chèvre (Nordic) étaient ensuite répartis dans chaque puits. Cet anticorps marqué par la phosphatase alcaline était dilué au 1/1000 dans le tampon PBS-lait 1%. Après incubation pendant une heure à  $37^\circ\text{C}$ , les plaques étaient lavées 4 fois. Après addition de 100  $\mu\text{l}$  de p-nitrophényl phosphate dilué dans du tampon diéthanol-amine à 10 %, l'intensité de la coloration jaune obtenue après incubation pendant une heure à  $37^\circ\text{C}$  était lue à 405 nm.

#### **Analyses statistiques.**

Aucune analyse n'a été effectuée sur les données concernant les femelles, le nombre de lapines par lot étant faible. L'analyse du titre en anticorps du sérum des lapereaux a été réalisée avec le test de Newman-Keuls (programme d'analyse de variance STATITCF).

Figure 1 : Evolution du taux d'immunoglobulines dans le sérum de lapines immunisées ou non avec *E. magna* précoce (série 1).

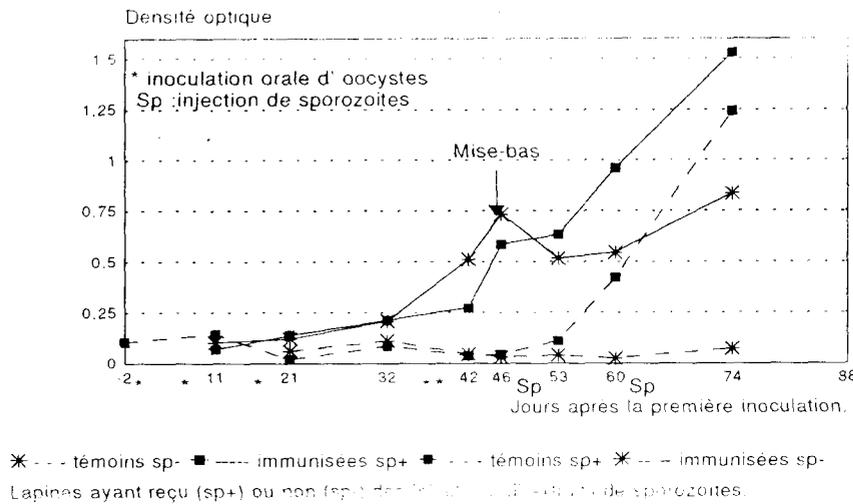
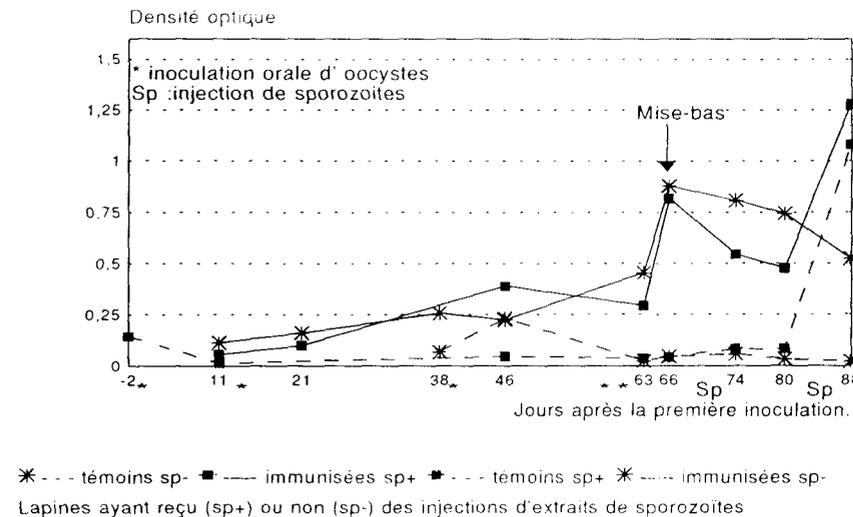


Figure 2 : Evolution du taux d'immunoglobulines dans le sérum de lapines immunisées ou non avec *E. magna* précoce (série 2).



RESULTATS

1. Evolution du taux d'immunoglobulines chez les lapines

Cette évolution, représentée sur les figures 1 et 2, était similaire dans les deux séries de femelles.

1. Comparaison entre les femelles immunisées et les femelles témoins pendant la gestation: pendant les 4 semaines suivant la première inoculation, le taux d'immunoglobulines (Ig) des lapines immunisées était peu différent de celui des lapines témoins. A la suite des deux inoculations précédant la mise bas, une montée rapide et importante du taux des Ig était observée avec un taux maximal six jours après la dernière inoculation. Les rappels successifs, pendant la gestation, ont permis aux lapines d'être totalement immunisées (aucune excrétion d'oocystes après la 3ème inoculation) comme l'a observé BEYER (1963).

2. Effet de l'injection d'extraits de sporozoïtes: chez les femelles non immunisées pendant la gestation, cette injection

a provoqué une montée rapide et très importante du taux des Ig dans le sérum, cet effet s'ajoutant à celui de l'immunisation orale chez les femelles immunisées.

2. Effet de l'inoculation d'épreuve sur les lapereaux

1. Taux d'immunoglobulines au moment du sevrage: les taux d'anticorps étant faibles, les Ig ont été dosées dans le sérum pur ou dilué au 1/10 (tableau 2). Le titre en Ig des sérums de lapereaux issus de lapines immunisées était significativement supérieur ( $P < 0.02$ ) à celui des lapereaux issus de lapines témoins. Le traitement des mères T ou I avec les extraits de sporozoïtes n'a pas provoqué d'augmentation significative du taux d'Ig chez les lapereaux.

2. Taux d'immunoglobulines après infection expérimentale: chez tous les lapereaux, le titre en anticorps mesuré 7 jours après inoculation était du même ordre de grandeur que le titre avant l'inoculation ( tableau 2 ).

3. Gain de poids et excrétion d'oocystes: la maladie a également été appréciée par la mesure du gain de poids (figures 3 et 4) et par l'excrétion parasitaire: quel que soit le taux d'anticorps de leur mère et leur propre taux, les lapereaux ont excrété la même quantité d'oocystes (environ  $6 \times 10^7$  oocystes d'*E. magna* précoce), et ont eu des courbes d'évolution du gain de poids similaires. Dans tous les lots, les lapereaux étaient malades. La chute du gain de poids et l'excrétion d'oocystes ont été relativement faibles mais conformes à ce qui était attendu avec la souche et la dose utilisées.

DISCUSSION

Les inoculations successives de la lignée précoce d'*E. magna* à des femelles adultes ont permis aux lapines d'acquérir une bonne immunité contre ce parasite. Nous n'avons pas observé d'excrétion d'oocystes dans la période peripartum ce qui ne correspond pas aux observations de terrain (GALLAZZI 1977, PEETERS *et al.* 1983) concernant *E. magna*. La raison est probablement une immunité plus forte due à des inoculations avec des doses plus élevées que dans les conditions du terrain.

Le titre en anticorps du sérum des lapereaux issus de mères immunisées était plus élevé que celui des lapereaux des lapines témoins. Nous pouvons supposer que les lapines transmettent des IgG aux lapereaux par voie transplacentaire et/ou par le colostrum comme chez la vache (FIEGE *et al.* 1992). Le passage des anticorps via le lait est certainement

**Tableau 2 : Titre en anticorps du sérum des lapereaux issus de lapines immunisées ou non, titre exprimé en densité optique à 405 nm.**

Age le jour du prélèvement de sang	dilution	TOS-	TOS+	IOS-	IOS+
29 jours	1/1	0,043 (0,013)	0,120 (0,030)	0,297 (0,031)	0,451 (0,089)
	1/10	0,027 (0,005)	0,048 (0,009)	0,246 (0,113)	0,297 (0,064)
39 jours	1/1	0,034 (0,024)	0,055 (0,045)	0,270 (0,127)	0,444 (0,160)
	1/10	0,019 (0,012)	0,028 (0,024)	0,096 (0,043)	0,163 (0,064)

**TOS-** : lapereaux nés de mères non immunisées, ne recevant pas d'injection de sporozoïtes en début de lactation.

**TOS+** : lapereaux nés de mères non immunisées, recevant deux injections de sporozoïtes en début de lactation.

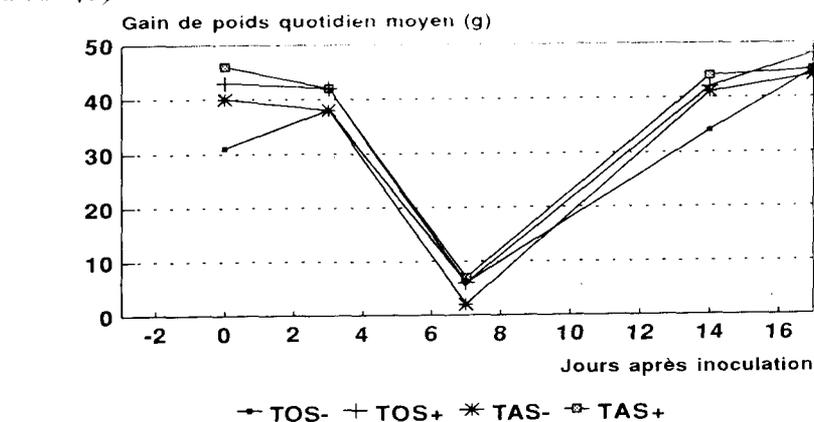
**IOS-** : lapereaux nés de mères immunisées, ne recevant pas d'injection de sporozoïtes en début de lactation.

**IOS+** : lapereaux nés de mères immunisées, recevant deux injections de sporozoïtes en début de lactation.

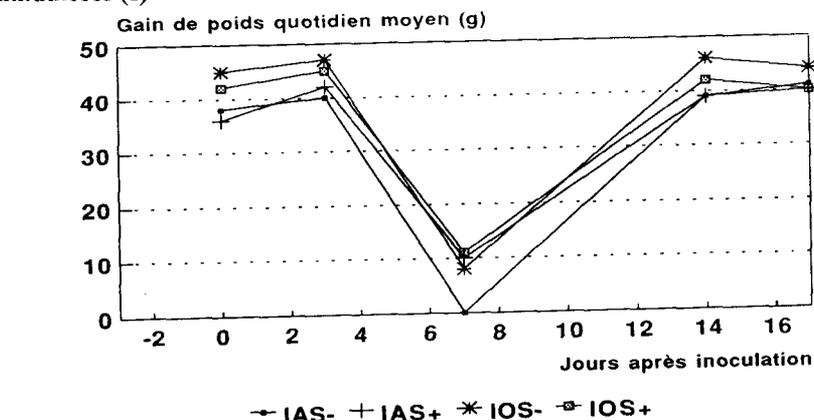
Pour chaque lot la moyenne est indiquée avec la déviation standard (-).

Le traitement des mères avec des extraits de sporozoïtes n'induit pas de différence entre les lapereaux issus de mères immunisées (comparaison IOS- et IOS+) et entre les lapereaux issus de mères témoins (comparaison TOS- et TOS+).

Les lapereaux I (IOS+ et IOS-) ont un titre en anticorps significativement plus élevé que celui des lapereaux T (TOS+ et TOS-) :  $P < 0,01$  à 29 jours et  $P < 0,02$  à 39 jours.

**Figure 3 : Gain de poids après inoculation des lapereaux allaités par les femelles témoins (T)**

O lapereaux nés des femelles témoins; A lapereaux adoptés.  
S+ injection d'extraits de sporozoïtes aux femelles allaitantes  
S- pas d'injection de sporozoïtes.

**Figure 4 : Gain de poids après inoculation des lapereaux allaités par les femelles immunisées (I)**

O lapereaux nés des femelles immunisées; A lapereaux adoptés.  
S+ injection d'extraits de sporozoïtes aux femelles allaitantes  
S- pas d'injection de sporozoïtes.

très faible car les titres en anticorps des lapereaux issus de mères traitées ou non avec des extraits de sporozoïtes étaient similaires. Cependant, quel que soit le taux d'Ig observé chez le lapereau, la maladie est exprimée de la même façon: chute de gain de poids et excrétion d'oocystes identiques. Ceci confirme d'autres travaux montrant que les anticorps sériques ne jouent pas de rôle majeur dans la protection contre les infections à *Eimeria*, la composante cellulaire étant très importante dans ce cas (HUGHES *et al.*, 1989).

En conclusion, cette étude a démontré que l'inoculation répétée d'oocystes d'une souche précoce d'*E. magna* permet aux femelles d'acquérir une immunité totale. Au sevrage, les lapereaux inoculés développent tous la maladie, au même degré, que leur mère soit immune ou non. Compte tenu de la dose utilisée pour l'inoculation d'épreuve des lapereaux, une immunité transmise même faiblement aurait été détectée car l'excrétion des témoins est inférieure au maximum possible (COUDERT 1989). Ainsi, que les mères soient totalement immunisées ou non, les lapereaux sont totalement sensibles à la coccidiose au moment du sevrage.

Reçu : 9 Février 1996.

Accepté : 28 Mai 1996.

REFERENCES

- BEYER T. 1963. Immunity in experimental coccidiosis of the rabbit caused by heavy infective doses of *Eimeria intestinalis*. In LUDVIK J. et al. (eds). *Progress in Protozoology, Prague: Czech Academy of Sciences*, 448.
- CATCHPOLE J., NORTON CC., GREGORY MW. 1993. Immunisation of lambs against coccidiosis. *The Veterinary record*, January 16, 56-59.
- COUDERT P. 1989. Some peculiarities of rabbit coccidiosis. Coccidia and intestinal coccidiomorphs. in: *Proc Vth International Coccidiosis Conference, Yvoré édit, Tours, 17-20 octobre, 481-488*.
- COUDERT P., VAISSAIRE J., LICOIS D. 1978. Etude de l'évolution de quelques paramètres sanguins chez les lapereaux atteints de coccidiose hépatique. *Recueil de Médecine Vétérinaire*, 154, 437-440.
- FIEGE N., KLATTE D., KOLLMANN D., ZAHNER H., BÜRGER HJ. 1992. *Eimeria bovis* in cattle: colostral transfert of antibodies and immune response to experimental infections. *Parasitology Research*, 78, 32-38.
- GALLAZZI D. 1977. Cyclical variations in the excretion of intestinal coccidial oocysts in the rabbit. *Folia veterinaria latina*, 7, 371-380.
- GILBERT J. M., BHANUSHALI JK., MC DOUGALD LR. 1988. An Enzyme-linked Immunosorbent Assay for coccidiosis in chickens: correlation of antibody levels with prior exposure to coccidia in the laboratory and in the field. *Avian diseases*, 32, 688-694.
- HUGHES HPA., WHITMIRE WM., SPEER CA. 1989. Immunity patterns during acute infection by *Eimeria bovis*. *Journal of Parasitology*, 75, 86-91.
- LICOIS D., COUDERT P., BOIVIN M., VIARD F., PROVOT F. 1988. Selection and characterization of a precocious line of *Eimeria intestinalis* an intestinal rabbit coccidium. *Parasitology Research*, 76, 192-198.
- LICOIS D., COUDERT P., DROUET-VIARD F., BOIVIN M. 1995. *Eimeria magna*: pathogenicity, immunogenicity and selection of a precocious line. *Veterinary Parasitology*, 60, 27-35.
- NOLAN A., GOLDRING OL., CATCHPOLE J., GREGORY MW., JOYNER LP. 1986. Demonstration of antibodies to *Eimeria* species in lambs by an enzyme-linked immunosorbent assay. *Research in Veterinary Science*, 42, 119-123.
- ONAGA H., TOGO M, KUDO Y, MOTOHASHI T, ISHII T. 1989. The use of an Enzyme linked Immunosorbent Assay for Estimation of the immune status of Chickens artificially immunized against coccidiosis. *Veterinary Parasitology*, 33, 199-205.
- PEETERS J., GEEROMS R., VAREWYCK H., BOUQUET Y., LAMPO P., HALEN P. 1983. Immunity and effect of clopidol/methyl benzoate and robenidine before and after weaning on rabbit coccidiosis in the field. *Research in Veterinary Science*, 35, 211-216.
- ROSE ME, PEPPARD JV, HOBBS SM. 1984. Coccidiosis: characterization of antibody responses to infection with *Eimeria nieschulzi*. *Parasite immunology*, 6, 1.
- SAATARA OZ H., STROMBERG BE., BEMRICK WJ. 1986. Enzyme-linked Immunosorbent Assay to Detect Antibody Response against *Eimeria bovis* and *Eimeria zurnii* in Calves. *The journal of parasitology*, 72 (5), 780-781.
- VIARD-DROUET F., COUDERT P., DURAND P., PROVOT F. 1983. Pathologie des reproductrices. Evolution de quelques paramètres plasmatiques chez des lapines primipares. *Annales de Recherches Vétérinaires*, 14, 105-115.