

**AMPLIFICATION DE LA REPOSE IMMUNITAIRE AU NIVEAU INTESTINAL ET SYSTEMIQUE
SUITE A L'IMMUNISATION DE POULETS *PER OS* PAR UNE PROTEINE RECOMBINANTE
PARASITAIRE ASSOCIEE A DEUX ADJUVANTS :
TOXINE CHOLERIQUE OU ISCOMS**

Girard Fabienne¹, Péry Pierre², Naciri Muriel¹, Quéré Pascale¹

¹Station de Pathologie Aviaire et Parasitologie, INRA- 37380 Nouzilly,

²Laboratoire de Virologie et Immunologie Moléculaires, INRA- 78352 Jouy-en-Josas.

Résumé

La mise au point d'une vaccination par des protéines recombinantes contre des parasites intestinaux comme les *Eimeria* aviaires oblige à l'induction, au niveau intestinal, d'une réponse immune forte, durable et orientée vers la production d'IgA. Les propriétés adjuvantes, de la toxine cholérique et de l'incorporation dans des ISCOMS, qui ont été démontrées au niveau de la muqueuse intestinale des mammifères, après une administration *per os*, ont été testées chez le poulet. L'administration *per os* de 4x200µg de l'antigène recombinant immunodominant IPE1, commun à plusieurs espèces d'*Eimeria*, n'induit qu'une faible réponse IgM dans l'intestin. L'incorporation dans des ISCOMS n'améliore pas la réponse immune en anticorps. La toxine cholérique (4x50µg) *per os*, induit une réponse significative en anticorps, au niveau sérique (IgA et IgG) dès la semaine 1 pi et intestinal (IgG) dès la semaine 3, preuve de la conservation de son immunogénicité. Elle exerce de plus un effet adjuvant significatif sur la réponse immune contre IPE1, intestinale (IgA en semaine 3 et IgG en semaine 4, dans le duodénum) et sérique (IgA en semaine 2). Néanmoins cet effet reste faible.

Introduction

La coccidiose aviaire est due à un protozoaire du genre *Eimeria*, parasite intracellulaire qui se développe dans les entérocytes. Les mesures de lutte reposent actuellement sur la chimioprévention systématique par des anticoccidiens. Cependant la nécessité de limiter les intrants chimiques dans les productions animales, la fréquence croissante des souches chimiorésistantes, et l'impossibilité de traiter certaines filières de production, imposent de pouvoir recourir à d'autres méthodes de prévention comme la vaccination. Mais la mise au point d'un vaccin utilisant des protéines recombinantes passe par la nécessité d'induire une réponse immune forte et durable au niveau du lieu de développement intestinal du parasite, et qualitativement adéquate. Après une infection par *Eimeria* chez le poulet, la réponse locale cellulaire semble primordiale dans la lutte contre le parasite, des controverses subsistant quant au type cellulaire impliqué préférentiellement (Lillehoj, 1989; Lillehoj et Bacon, 1991; Vervelde *et al.*, 1993; Rothwell *et al.*, 1995). Les IgA sécrétoires pourraient également jouer un rôle important (Davis *et al.*, 1978; Davis et Porter, 1979; Mockett et Rose, 1986).

Pour obtenir une bonne réponse immune, il faut donc utiliser un adjuvant adapté. Donnée *per os*, la toxine cholérique a fait la preuve chez les mammifères de son efficacité comme adjuvant pour induire une immunité intestinale forte, durable et orientée vers une réponse auxiliaire de type 2 associée à la production d'IgA sécrétoires (Lycke et

Holmgren, 1986; Munoz *et al.*, 1990; Wilson *et al.*, 1990; Xu-Amano *et al.*, 1993). Son effet est très peu étudié chez le poulet (Hoshi *et al.*, 1995). La protection de l'antigène dans des ISCOMS, qui incorporent de plus de la Quil A, un adjuvant des muqueuses efficace, s'avère aussi intéressante pour permettre l'induction d'une immunité après délivrance *per os* (Mowat et Donachie 1991; Kazanji *et al.*, 1994; Maloy *et al.*, 1994).

L'objectif de notre étude est d'évaluer, chez des poulets, la réponse immune en anticorps après une administration *per os* de l'antigène recombinant IPE1, commun à plusieurs espèces d'*Eimeria* (Laurent *et al.*, 1994), associé à la toxine cholérique ou à des ISCOMS. L'immunité locale est évaluée, au niveau de deux portions intestinales, duodénum et caecums, par la quantité d'anticorps relargués après une mise en culture *ex vivo* de 16 heures (Zigterman *et al.*, 1993).

Matériel et méthodes

1. Poulets

Des poulets d'une lignée histocompatible Leghorn blanche (B13/B13) ont été utilisés à l'âge de 2 mois.

2. Antigène et adjuvants

Le gène codant pour l'antigène IPE1 a été isolé d'une banque d'ADNc obtenue à partir d'oocystes sporulés d'*E. acervulina* (Laurent, 1994). La protéine est exprimée dans *E. coli* grâce au vecteur

d'expression pGEx (Smith *et al.*, 1988). Les ISCOMS sont préparés selon la procédure originale de Lövgren *et al.*, (1987), modifiée par Kazanji *et al.*, (1994). La présence de IPE1 dans les ISCOMS est vérifiée par électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS. La quantité de protéine incorporée dans les ISCOMS est estimée par le test à l'acide bicinconinique (BCA, Pierce). La toxine cholérique est obtenue chez Sigma

TABLEAU 1 : Dosage des immunoglobulines spécifiques anti-IPE1, IgM (1/1), IgA (1/1) et IgG (1/4) au niveau duodénal et caecal. 3 et 4 semaines après une immunisation avec l'antigène recombinant IPE1 incorporé ou non dans des ISCOMS et associé ou non à un adjuvant, la toxine cholérique.

	Témoins sains	IPE1	ISCOMS IPE1	ISCOMS IPE1 +Tox. cholérique
Duodénum				
Semaine 3				
IgM	0.042±0.008 ^{*a}	0.092±0.009 ^b	0.098±0.013 ^b	0.103±0.018 ^b
IgA	0.294±0.031	0.290±0.022 ^{#c}	0.321±0.029	0.382±0.022 ^{#d}
IgG	0.244±0.041	0.178±0.003	0.137±0.018	0.174±0.031 [#]
Semaine 4				
IgM	0.012±0.003 ^a	0.087±0.015 ^b	0.111±0.018 ^b	0.106±0.016 ^b
IgA	0.259±0.038	0.313±0.039	0.400±0.046	0.370±0.031
IgG	0.177±0.025	0.172±0.066 ^c	0.191±0.037 ^e	0.807±0.270 ^{d,f}
Caecum				
Semaine 3				
IgM	0.036±0.005 ^a	0.099±0.017 ^b	0.109±0.017 ^b	0.110±0.019 ^b
IgA	0.171±0.028 ^a	0.254±0.012 ^b	0.284±0.029 ^b	0.290±0.018 ^b
IgG	0.490±0.093	0.465±0.025 [#]	0.443±0.06 [#]	0.489±0.111 [#]
Semaine 4				
IgM	0.013±0.004 ^a	0.103±0.005 ^b	0.104±0.002 ^b	0.129±0.012 ^b
IgA	0.102±0.012 ^a	0.309±0.018 ^b	0.308±0.025 ^b	0.362±0.031 ^b
IgG	0.606±0.065	0.604±0.125	0.632±0.096	1.232±0.332

a, b : valeurs significativement différentes (Test de Student) entre la D. O405 des poulets témoins sains et celle des poulets immunisés avec l'antigène recombinant IPE1 incorporé ou non dans des ISCOMS, associés ou non à la toxine cholérique.

c, d : valeurs significativement différentes (Test de Student) entre la D. O405 des poulets immunisés avec l'antigène recombinant IPE1 et celle des poulets immunisés avec l'antigène recombinant IPE1 incorporé dans des ISCOMS et associé à la toxine cholérique.

e, f : valeurs significativement différentes (Test de Student) entre la D. O405 des poulets immunisés avec l'antigène recombinant IPE1 incorporé dans des ISCOMS et celle des poulets immunisés avec l'antigène recombinant IPE1 incorporé dans des ISCOMS et associé à la toxine cholérique.

TABEAU 2 : Dosage des immunoglobulines spécifiques anti-toxine cholérique, IgM (1/1), IgA (1/4) et IgG (1/16) au niveau duodénal et caecal, 3 et 4 semaines après une immunisation avec l'antigène recombinant IPE1 incorporé dans des ISCOMS et associé ou non à un adjuvant, la toxine cholérique.

	ISCOMS IPE1		ISCOMS IPE1+Tox. cholérique	
Duodénum	Semaine 3	Semaine 4	Semaine 3	Semaine 4
IgM	0,030±0,008	0,022±0,005	0,052±0,010	0,057±0,004
IgA	0,102±0,015	0,107±0,016	0,092±0,015	0,123±0,031
IgG	0,001±0,001 ^a	0,005±0,001 ^a	0,264±0,054 ^{*bce}	0,522±0,084 ^{bf}
Caecum	Semaine 3	Semaine 4	Semaine 3	Semaine 4
IgM	0,040±0,011	0,031±0,006	0,060±0,0006	0,067±0,002
IgA	0,032±0,012	0,022±0,003	0,059±0,017	0,060±0,010
IgG	0,002±0,001 ^a	0,004±0,002 ^a	0,636±0,033 ^{*bd}	0,655±0,081 ^b

représente la moyenne de la différence de densité optique mesurée entre t. 0 et t. 16 pour 6 poulets (sauf pour # où N=5) avec pour chaque segment intestinal 3 ou 4 répétitions (Moy. ± S. E. M).

a, b : valeurs significativement différentes (Test de Student) entre la D. O405 de poulets immunisés avec l'antigène recombinant IPE1 incorporé dans des ISCOMS et celle des poulets immunisés avec l'antigène recombinant IPE1 incorporé dans des ISCOMS et associé à la toxine cholérique.

c, d : valeurs significativement différentes (Test de Student) entre la D. O405 mesurée au niveau duodénal ou caecal des poulets immunisés avec l'antigène recombinant IPE1 incorporé dans des ISCOMS et associé à la toxine cholérique.

e, f : valeurs significativement différentes (Test de Student) entre la D. O405 mesurée entre les semaines 3 et 4 après l'immunisation des poulets immunisés avec l'antigène recombinant IPE1 incorporé dans des ISCOMS et associé à la toxine cholérique.

3. Protocole expérimental

Quatre groupes de 12 poulets ont été constitués, dont un témoin non immunisé (0). Un deuxième groupe a reçu 4 inoculations *per os* de 200µg de IPE1 à 2 jours d'intervalle. Un troisième groupe a été immunisé de la même manière avec 200µg d'IPE1 incorporé dans des ISCOMS (ISCOMS IPE1). Un quatrième groupe a reçu 4 fois 200µg d'ISCOMS-IPE1 avec 50µg de toxine cholérique (ISCOMS IPE1/TC). Des prises de sang sont effectuées de la première à la quatrième semaine après la dernière immunisation. Six poulets par groupe sont sacrifiés à la troisième et quatrième semaine pi afin de déterminer la production des anticorps locaux au niveau du duodénum et des caecums.

4. Technique de production des anticorps locaux intestinaux

La technique de culture *ex vivo* des fragments intestinaux chez le poulet a été mise au point par Zigterman *et al.*, (1993). Quatre répétitions de 1g sont effectuées par portion intestinale.

5. Tests E.L.I.S.A.

Pour le dosage des anticorps du sérum ou des surnageants de culture intestinaux, IPE1 (5µg/ml) est adsorbé sur des plaques de microtitration Nunc, et la toxine cholérique (2µg/ml) sur des plaques Dynatech Immulon II. Les isotypes des anticorps spécifiquement fixés sur l'antigène, sont révélés par un sérum polyclonal anti-chaine a de l'IgA de

poulet (Bethyl) couplé à la peroxydase, ou par un sérum polyclonal de lapin anti-fragment Fc de l'IgG de poulet (Interchim) couplé à la phosphatase alcaline (pour IPE1) ou à la peroxydase (pour la toxine cholérique dans la réponse intestinale), ou par un sérum polyclonal de chèvre anti-chaine µ de l'IgM de poulet (Bethyl) couplé à la peroxydase.

6. Analyse statistique

Les moyennes (SEM) sont données pour 6 ou 12 poulets. La comparaison des moyennes est effectuée par le test t de Student.

Résultats et discussion

Nos résultats montrent que l'administration *per os* de 4x200µg de l'antigène IPE1 sans adjuvant induit une faible réponse IgM au niveau duodénal et caecal en semaines 3 ($p<0.01$) et 4 ($p<0.001$) pi ainsi qu'une réponse de type IgA au niveau duodénal et caecal pendant la semaine 3 ($p<0.01$) et 4 ($p<0.001$) (TABLEAU 1). Par contre aucune réponse sérique n'est observée (TABLEAU 3), ce qui est conforme avec les études chez les mammifères (Lycke et Holgrem, 1986; Wilson *et al.*, 1990).

L'incorporation de IPE1 dans des ISCOMS, n'améliore pas, dans notre étude, l'amplitude ou la qualité de la réponse immune en anticorps locaux intestinaux (TABLEAU 1) ou sériques (TABLEAU 3) après une administration *per os*. Les ISCOMS sont des particules de 40nm de

diamètre, combinant une présentation multimérique de l'antigène avec un adjuvant incorporé, la Quil A. Le rapport entre l'adjuvant et l'antigène incorporés reste toutefois empirique. Les ISCOMS ont démontré leur efficacité dans des stratégies d'immunisation *per os* chez les mammifères du fait de leur résistance aux acides et aux sels biliaries (Mowat et Donachie, 1991. Kazenji *et al.*, 1994; Maloy *et al.*, 1994). D'autres études sont nécessaires chez le poulet en modifiant les protocoles d'immunisation, pour démontrer leur possible effet d'adjuvant au niveau de la muqueuse intestinale.

Par contre, notre étude montre que la toxine cholérique, administrée par voie orale chez le poulet reste immunogène, ce qui prouve donc que, s'il y a dégradation dans l'intestin, celle-ci reste partielle. Au niveau de la muqueuse duodénale et caecale, une forte réponse spécifique anti-toxine cholérique, significative de type IgG est observée dès la semaine 3 pi ($p < 0.001$) (TABLEAU 2). De plus dès la semaine 1 pi, apparaît une réponse sérique significative en IgA ($p < 0.05$) et très forte en IgG ($p < 0.001$) (TABLEAU 4). Ces résultats sont originaux chez le poulet.

Non seulement la toxine cholérique garde ses capacités immunogènes, mais elle exerce aussi de façon indubitable un effet adjuvant sur la réponse immune contre IPE1. Les IgA spécifiques duodénales sont augmentées significativement en semaine 3 ($p < 0.05$) et les IgG spécifiques sont augmentées significativement au niveau du duodénum en semaine 4 ($p < 0.05$) et de façon moindre au niveau du caecum, où la réponse non spécifique reste élevée (TABLEAU 1). La réponse IgA sérique est significativement accrue en semaine 2, et celle en IgG commence à croître en semaine 4 (TABLEAU 3).

En conclusion, la toxine cholérique semble pouvoir jouer un rôle adjuvant *per os* dans la réponse immune contre un antigène non réplicatif, avec une orientation vers la production d'IgA comme

pour les mammifères (Wilson *et al.*, 1990; Xu-Amon *et al.*, 1993). Toutefois cet effet adjuvant reste de faible amplitude, ce qui pose la question de son utilisation dans la pratique.

Références

- Davis P.J., Porter P.A., 1979. *Immunology*, 36, 471-477.
- Davis P.J., Parry S.H., Porter P.A., 1978. *Immunology*, 34, 879-888
- Hoshi S., Nakamura T., Nunoya T., Ueda S., 1995. *Vaccine*, 13, 245-252
- Kazanji M., Laurent F., Péry P., 1994. *Vaccine*, 12, 798-804
- Laurent F., Bourdieu C., Kazanji M., Yvoré P., Péry P., 1994. *Mol. Bioch. Parasitol.*, 63, 79-86
- Lillehoj H. S., 1989. *Infect. Imm.*, 57, 1879-1884
- Lillehoj H. S., Bacon L. D., 1991. *Avian Dis.*, 35, 294-301
- Lykke N., Holmgren J., 1986. *Immunology*, 59, 301-308
- Maloy K. J., Donachie A. M., O'Hagan D. T., Mowat A. M., 1994. *Immunology*, 81, 661-667
- Mockett A. P. A., Rose E. M., 1986. *Parasite Immunol.*, 8, 481-489
- Mowat A. M., Donachie A. M., 1991. *Immunol. Today*, 12, 383-385
- Munoz E., Zubiana A. M., Merrow M., Sauter N. P., Huber B. T., 1990. *J. Exp. Med.*, 172, 95-103
- Rothwell L., Graminski R. A., Rose M. E., Kaiser P., 1995. *Parasite Immunol.*, 17, 525-533
- Vervelde L., Vermeulen A. N., Jeurissen S. H. M., 1993. *Vlth International Coccidiosis Conference* (Barta J. R. and Fernando A. Ed.), p 144
- Wilson A. D., Clarke C. J., Stokes C. R., 1990. *Scand. J. Immunol.*, 31, 443-451
- Xu-Amano J., Kiyono H., Jackson R. J., Staats H. F., Fujihashi K., Burrows P. D., Elson C. O., Pillai S., 1993. *J. Exp. Med.*, 178, 1309-1320
- Zigterman G. J. W. J., Van de ven W., Van Geffen C., Loeffen A. H. C., Panhuijzen J. H. M., Rijke E. O., Vermeulen A. N., 1993. *Vet. Immunol. Immuno-pathol.*, 36, 281-291

TABEAU 3 : Dosage des immunoglobulines spécifiques anti IPE1 IgA (1/160) et IgG (1/640) au niveau sérique, une, deux, trois et quatre semaines après une immunisation avec l'antigène recombinant IPE1 incorporé ou non dans des ISCOMS et associé ou non à un adjuvant, la toxine cholérique.

	Témoins sains	IPE1	ISCOMS IPE1	ISCOMS IPE1 +Tox. cholérique
IgA				
Semaine 1 (N=12)	0.060±0.004*	0.069±0.004	0.073±0.005	0.102±0.022
Semaine 2 (N=12)	0.062±0.020 ^a	0.065±0.005 ^a	0.076±0.004 ^a	0.151±0.046 ^b
Semaine 3 (N=6)	0.079±0.006	0.063±0.005	0.069±0.013	0.069±0.013
Semaine 4 (N=6)	0.063±0.005	0.064±0.004	0.060±0.003	0.069±0.007
IgG				
Semaine 1 (N=12)	0.400±0.070	0.530±0.058	0.508±0.045	0.701±0.114
Semaine 2 (N=12)	0.420±0.050	0.480±0.099	0.330±0.026	0.414±0.044
Semaine 3 (N=6)	0.416±0.026	0.395±0.051 [#]	0.317±0.045	0.315±0.055
Semaine 4 (N=6)	0.397±0.124	0.564±0.116 [#]	0.526±0.062	0.903±0.288

a, b : valeurs significativement différentes (Test de Student) entre la D. O405 de poulets témoins sains et celle de poulets immunisés avec l'antigène recombinant IPE1 incorporé ou non dans des ISCOMS et associés ou non à la toxine cholérique.

TABEAU 4 : Dosage des immunoglobulines spécifiques anti toxine cholérique IgA (1/80) et IgG (1/640) au niveau sérique. 1, 2, 3 et 4 semaines après une immunisation avec l'antigène recombinant IPE1 incorporé ou non dans des ISCOMS et associé ou non à un adjuvant, la toxine cholérique.

	IPE1	ISCOMS IPE1	ISCOMS IPE1 +Tox. cholérique
IgA			
Semaine 1 (N=12)	0.040±0.004 ^a	0.045±0.013 ^a	0.065±0.006 ^{bc}
Semaine 2 (N=12)	0.029±0.004 ^a	0.021±0.01 ^a	0.066±0.004 ^{bc}
Semaine 3 (N=6)	0.029±0.010 ^a	0.045±0.008	0.097±0.01 ^{bd}
Semaine 4 (N=6)	0.058±0.007 ^a	0.061±0.010 ^a	0.113±0.009 ^{bd}
IgG			
Semaine 1 (N=12)	0.017±0.004 ^a	0.055±0.007 ^a	1.150±0.158 ^{bc}
Semaine 2 (N=12)	0.038±0.007 ^a	0.053±0.007 ^a	2.090±0.223 ^{bd}
Semaine 3 (N=6)	0.032±0.013 ^a	0.068±0.024 ^a	2.789±0.054 ^{bd}
Semaine 4 (N=6)	0.031±0.012 ^a	0.015±0.008 ^a	2.565±0.073 ^{bd}

représente la moyenne N=6 ([#]N=5) de la densité optique mesurée au niveau sérique (Moy. ± S.E.M).

a, b : valeurs significativement différentes (Test de Student) entre la D. O405 des poulets IPE1 ou ISCOMS IPE1 et celle des poulets ISCOMS IPE1 + Tox. cholérique.

c, d : valeurs significativement différentes entre la D. O405 des semaines 1, 2, 3 et 4, pour les poulets ISCOMS IPE1 + Tox. cholérique.