

## INTRODUCTION

La coccidiose est une maladie provoquée par un parasite protozoaire du genre *Eimeria*. C'est une maladie qui entraîne d'énormes conséquences économiques sur l'industrie des élevages de poulets et de lapins. Chez le lapin, il existe dix espèces différentes de coccidies. Neuf d'entre elles sont à localisation intestinale: *E. perforans*, *E. exigua*, *E. media*, *E. intestinalis*, *E. magna*, *E. irresidua*, *E. flavescens*, *E. coecicola*, *E. piriformis*, une seule espèce *E. stiedae*, parasite le foie. Dans la maladie hépatique le foie est considérablement hypertrophié et sa surface est marquée de nodosités blanchâtres (Figure 1).

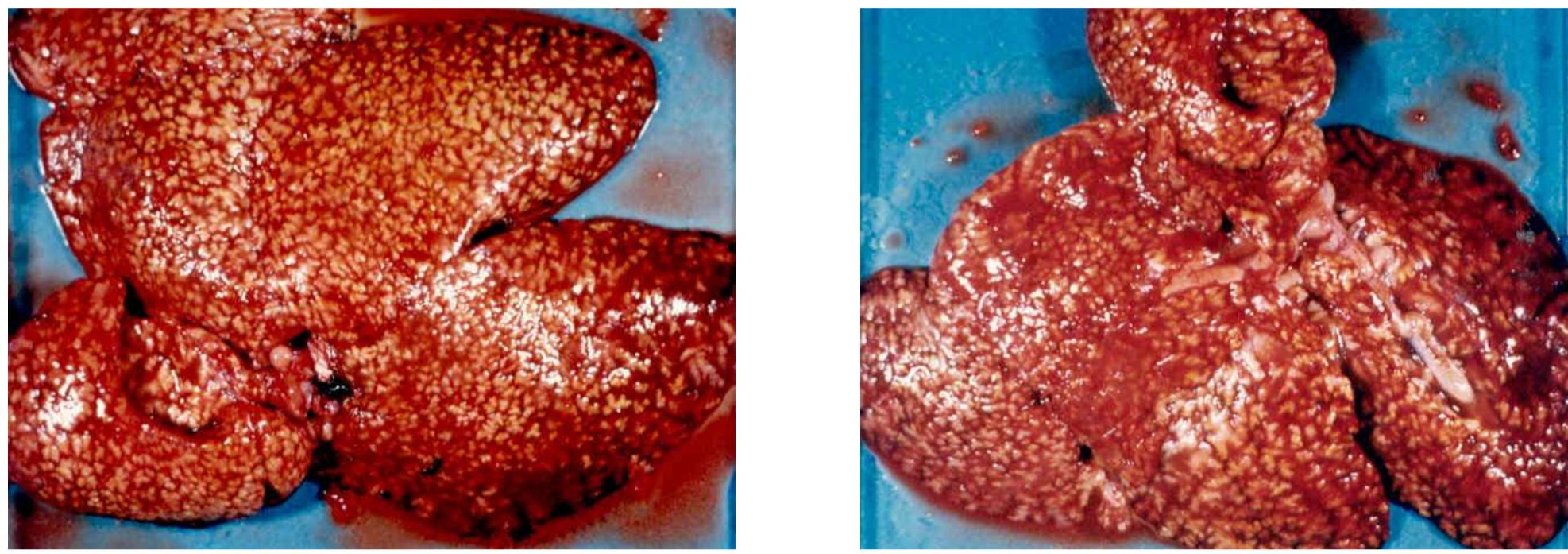


Fig. 1: Foie de lapin infecté expérimentalement avec  $2 \times 10^4$  oocystes sporulés d'*E. stiedae*

Actuellement, la coccidiose est contrôlée en utilisant des produits coccidiostatiques dans les aliments des jeunes animaux, mais des problèmes secondaires importants sont apparus, en particulier le développement de souches d'*Eimeria* résistantes aux médicaments. Par conséquent, une attention particulière a été portée sur l'étude de vaccins biologiques pour le contrôle de ces parasites.

## METHODOLOGIE ET RESULTATS

### I. IDENTIFICATION ET CARACTERISATION D'UNE PROTEINE RECOMBINANTE CODANT POUR UN ANTIGENE DE SPOROZOITE D'*Eimeria stiedae*

**OBJECTIF :** Produire par génie-génétique, un antigène recombinant qui induit une réponse immunitaire protectrice contre le parasite qui cause la coccidiose chez le lapin.

#### 1. Isolement de sporozoïtes d'*E. stiedae*:

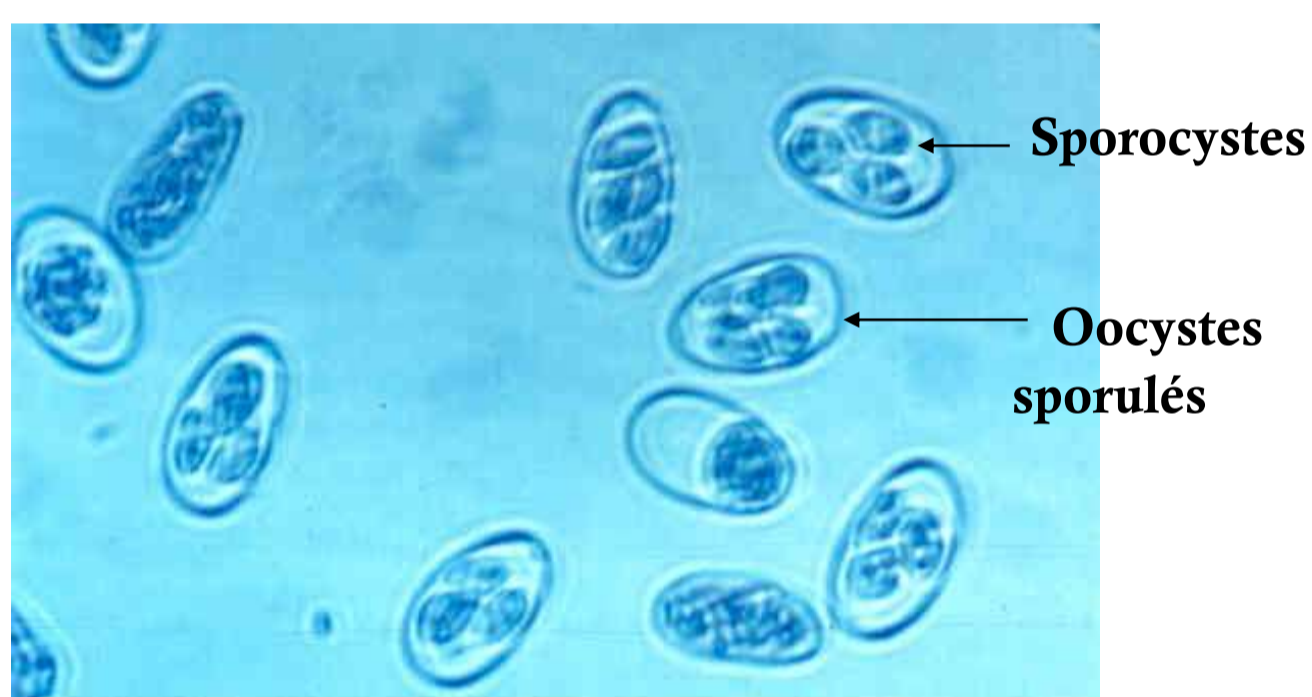


Fig.2 : Isolement d'oocystes sporulés



Fig.3 : Isolement de sporozoïtes

#### 2. Extraction de l'ADN

3. Construction et criblage d'une banque génomique dans  $\lambda$ gt<sub>11</sub> et isolement de l'ADN du phage recombinant. (Figure 4).

4. Caractérisation de la protéine de fusion  $\beta$ -gal fusion (138 Kd) (Figure 5).

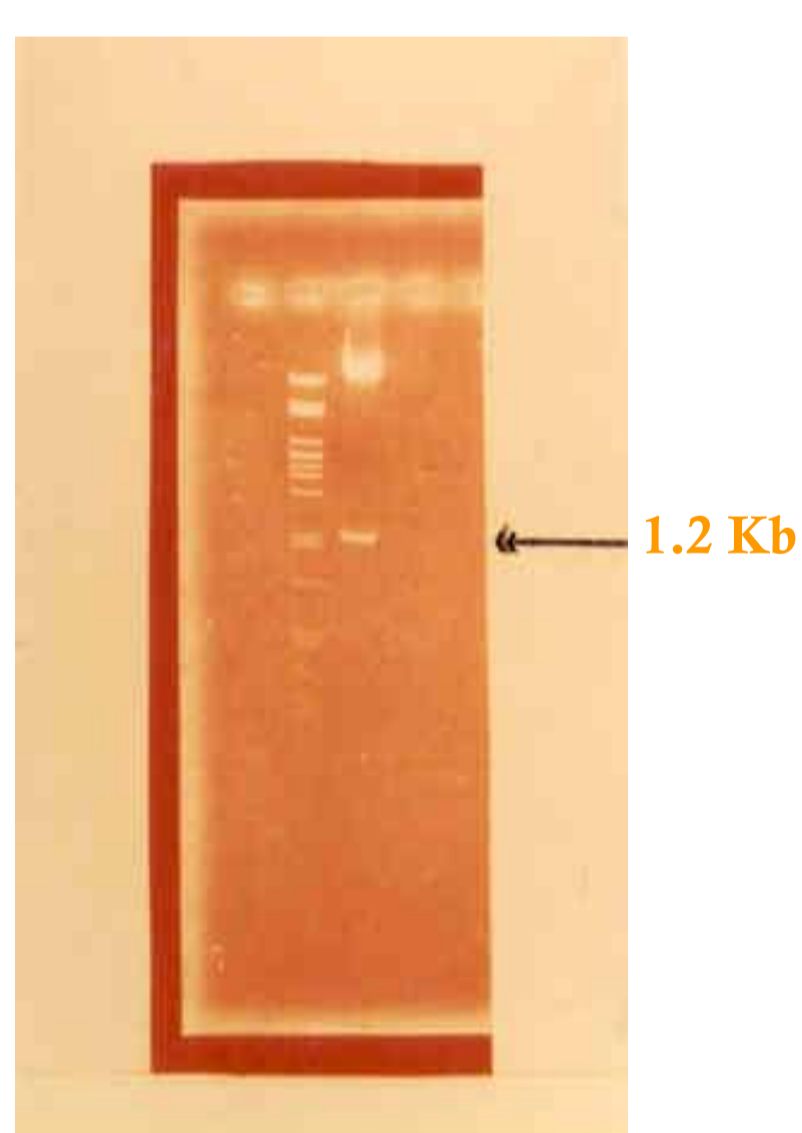


Fig.4 : ADN du phage Recombinant après digestion par EcoRI, migration en parallèle d'un marqueur  $\lambda$ Pst1 (Kb).

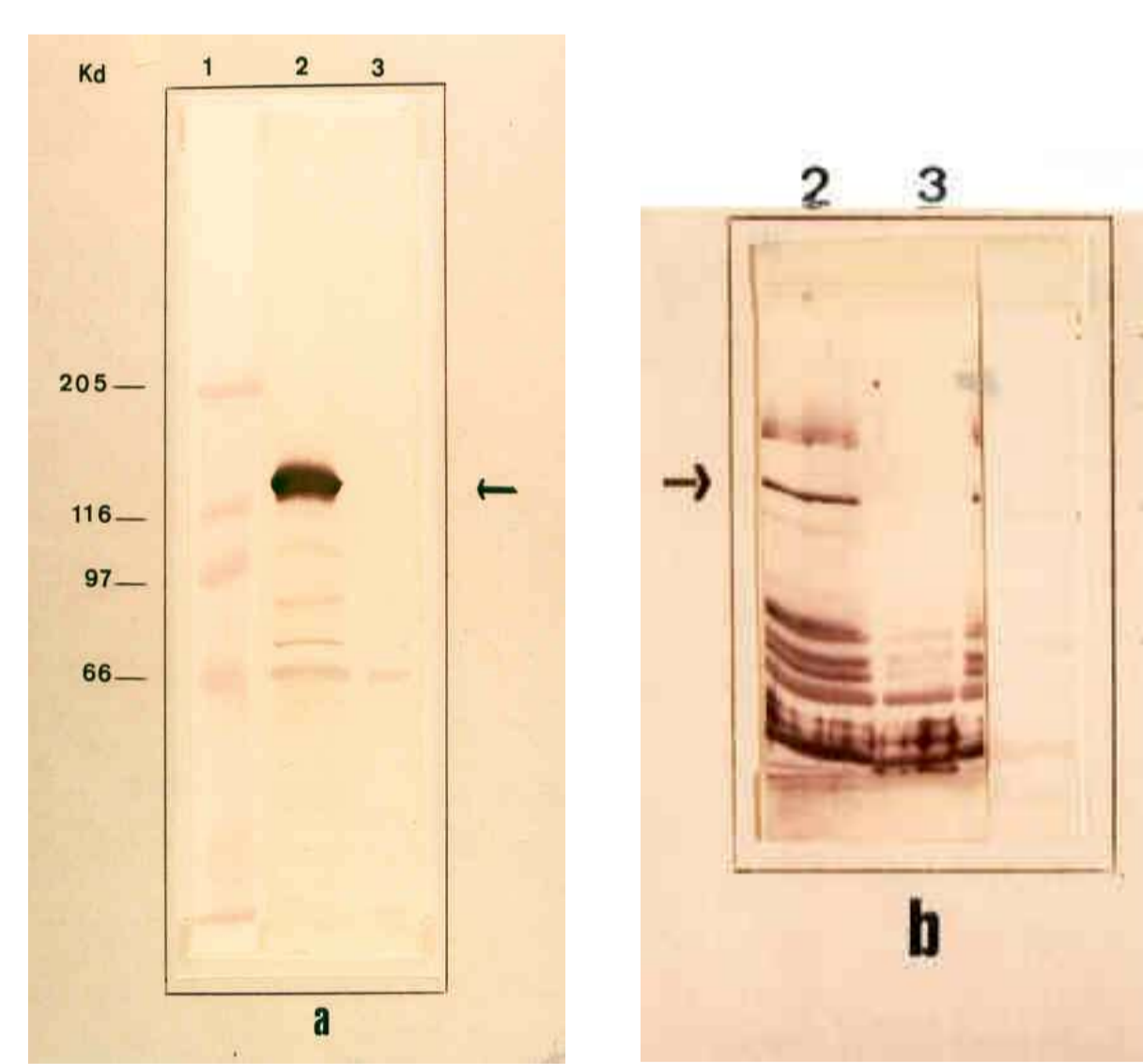


Fig.5 : Analyse par Western-Blot du phage lysogène recombinant. Révélation avec le sérum anti-sporozoïte de lapin (a) et le sérum recombinant (b).

1: Haut poids moléculaire (Kd).

2: Lysogène recombinant induit.

3: Lysogène recombinant non induit.

#### 5. Analyse par la méthode d'immunofluorescence indirecte (Figure 6).

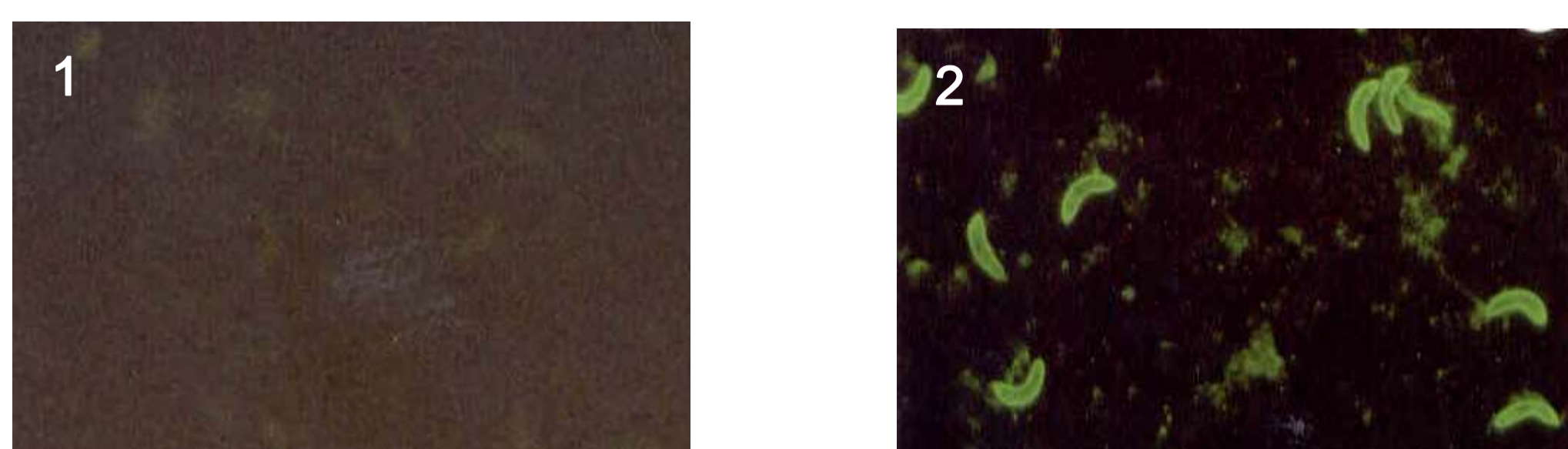


Fig.6: Immunofluorescence indirecte des sporozoïtes d'*E. stiedae* séchés sur lames

1 : Révélation avec le présérum (contrôle négatif) 2 : Sérum recombinant

#### 6. Analyse par Southern-Blot de l'ADN génomique

7. Séquençage du fragment d'ADN (Est.R1: 1.2 Kb) par la méthode de « dideoxy-chain-termination » de Sanger.

## II. ETUDE IN-VITRO : INHIBITION D'INVASION DES SPOROZOITES DANS LES CELLULES MDBK (Madin-Darby-Bovine-Kidney).

### OBJECTIFS

1. Infection des cellules MDBK par les sporozoïtes d'*Eimeria stiedae*.
2. Incubation avec le présérum et le sérum dirigé contre la protéine recombinante  $\beta$ -gal.
3. Examen au microscope pour détecter la présence des parasites intracellulaire (Figure 7).

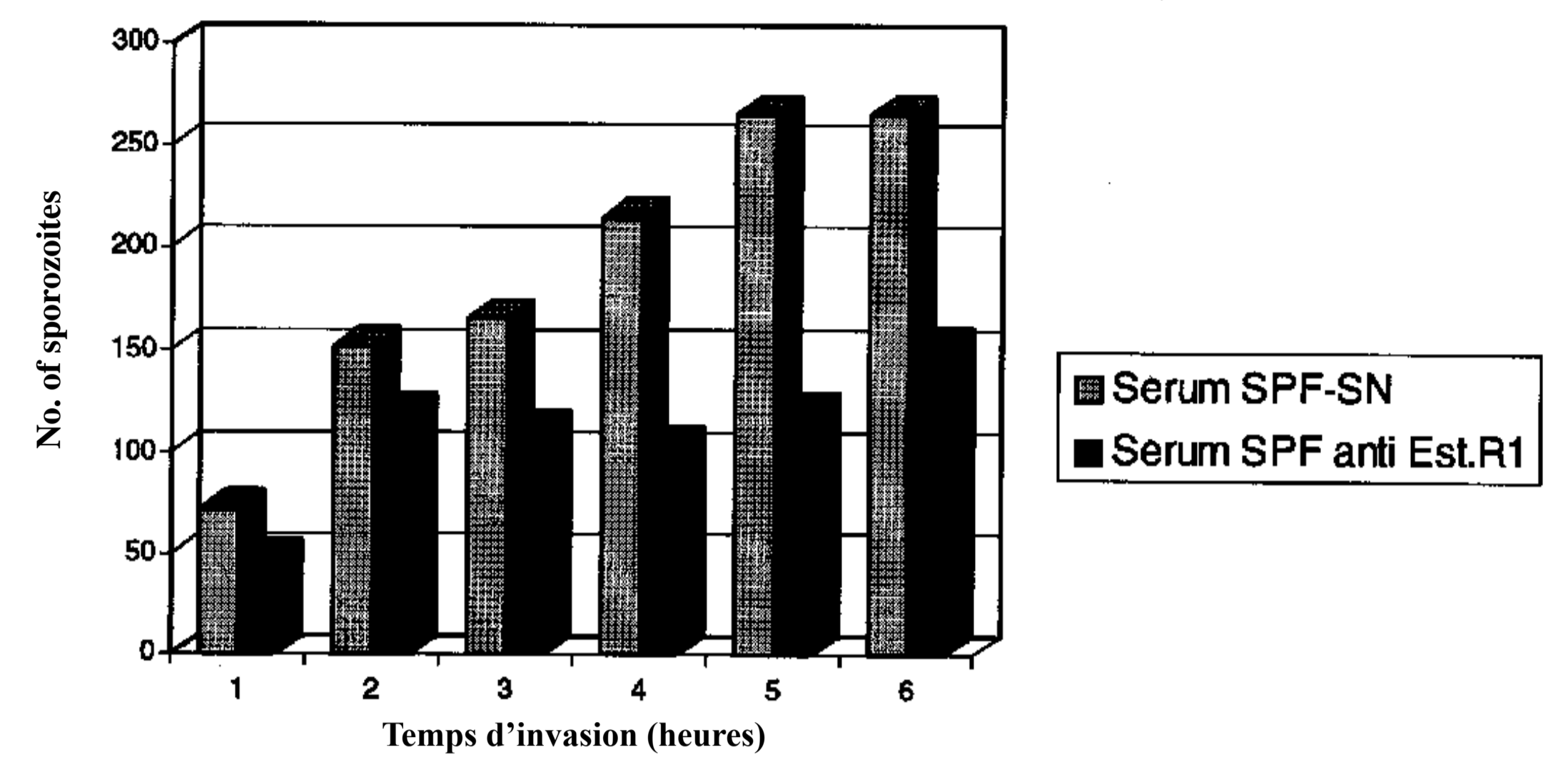


Fig. 7: Invasion des cellules MDBK par les sporozoïtes d'*E. stiedae* qui ont été prétraitées avec le sérum recombinant (SPFanti Est.R1) et le présérum (SPF-SN) contrôle négatif.

## III. SOUS-CLONAGE DU FRAGMENT D'ADN EstR1 DANS LE VECTEUR D'EXPRESSION CONTENANT LA LIPOPROTEINE DU GENE oprI DE Pseudomonas aeruginosa (pVUB1) (P.Cornelis et al, 1996).

**OBJECTIF :** Examiner les possibilités d'utiliser la lipoprotéine I de *Pseudomonas aeruginosa* pour le transport de la protéine antigénique à la surface de la cellule de la bactérie en vue de développer de nouveaux types de vaccin vivant.

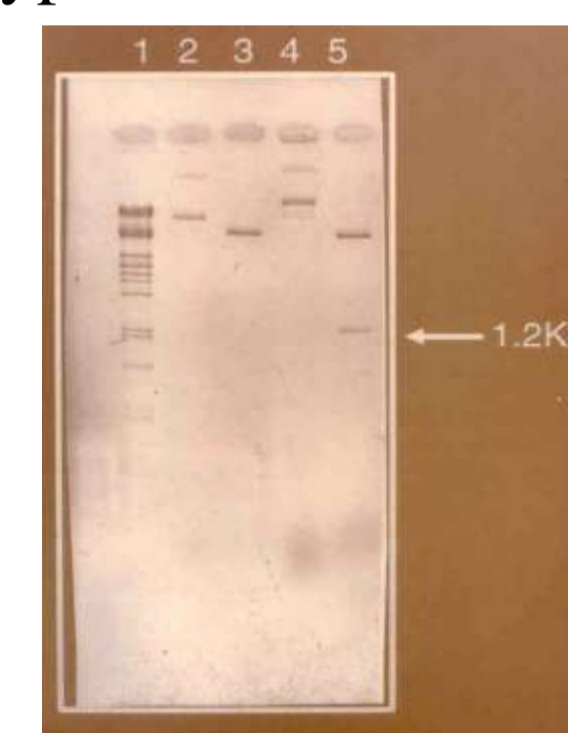


Fig. 8 : Sous-clonage du fragment d'ADN dans le vecteur d'expression pVUB1. Visualisation sur gel d'agarose 1.2% de l'ADN du clone pR1

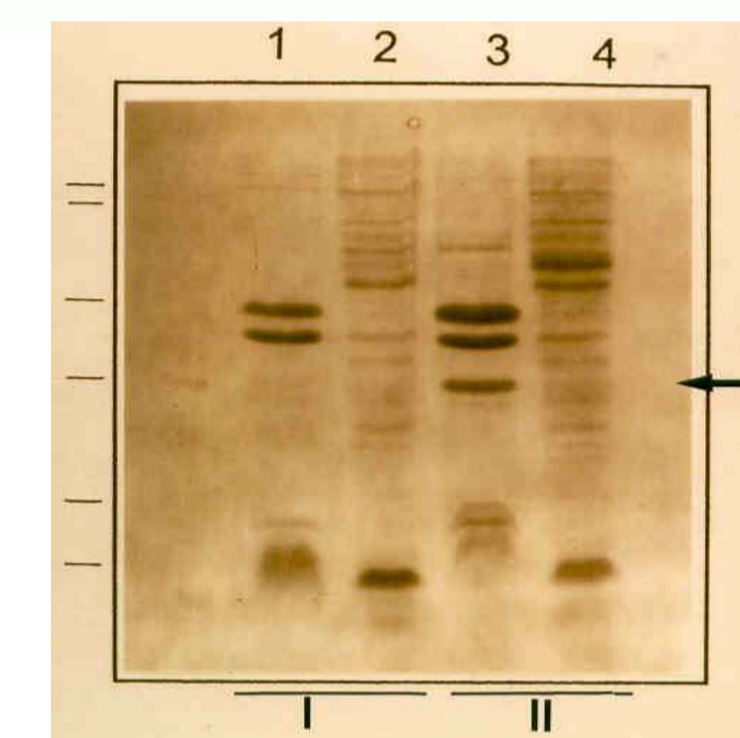


Fig. 9 : Séparation sur gel SDS-PAGE 17.5% des fractions membranaires (1-3) et cytoplasmiques (2-4) des extraits de protéine de pVUB1 (I) et pR1 (II).

## IV. PROPRIETES IMMUNOGENES DE LA PROTEINE DE FUSION LIPOPROTEINE I/Est.R1

**OBJECTIF :** Analyse des propriétés adjuvantes de la lipoprotéine du gène *oprI* *P. aeruginosa*.

1. Préparation des protéines de fusion pour les immunisations.
2. Essais d'immunisations des souris Balb/c avec les protéines de fusion.
3. Test ELISA (Enzyme-Linked-Immunoabsorbent-Assay) (Figure 10).

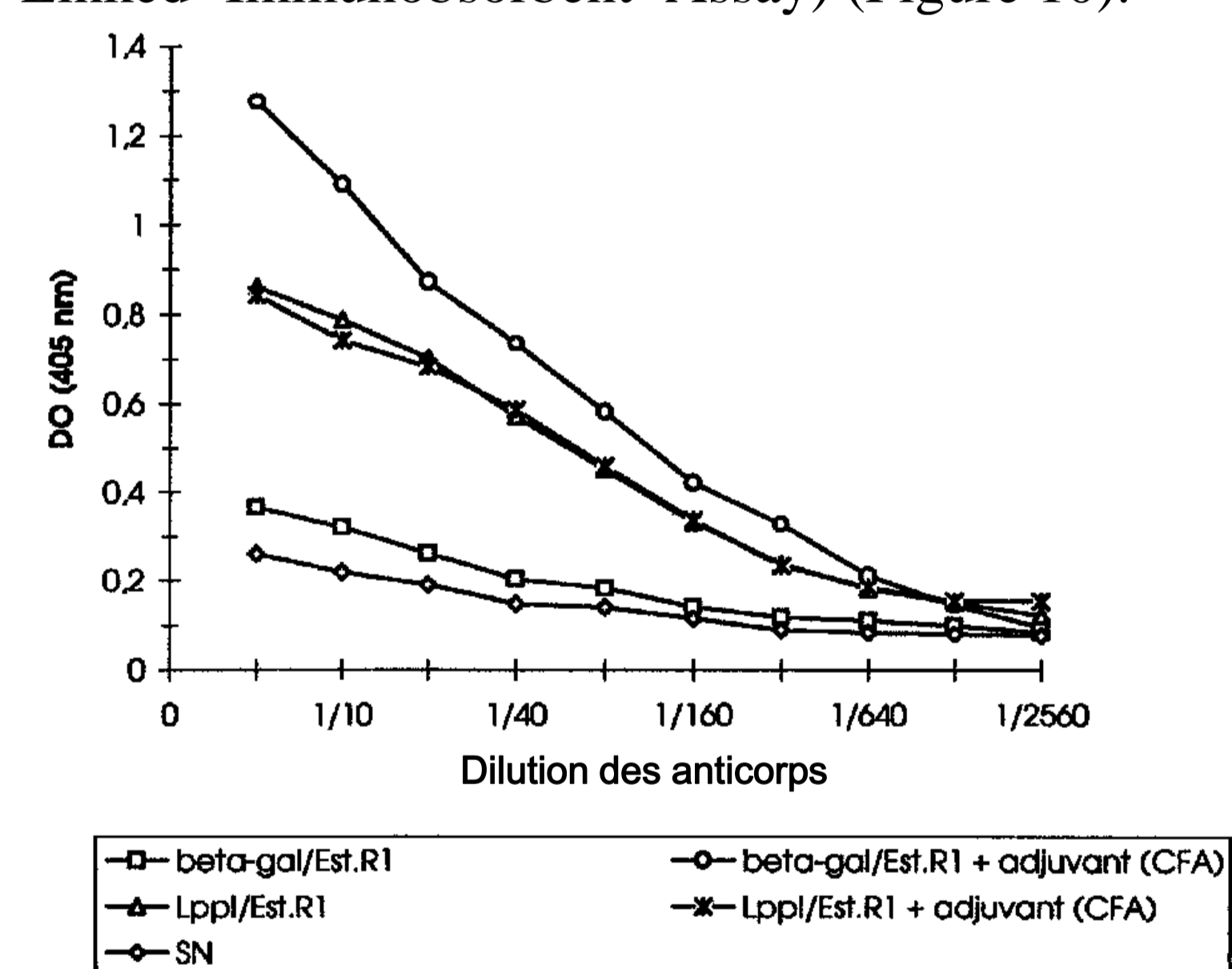


Fig. 10 : Propriétés adjuvantes de la lipoprotéine (*oprI*) de *Pseudomonas aeruginosa*: Analyse par test ELISA sur des extraits d'antigènes d'oocystes sporulés d'*E. stiedae*.

## V. ETUDE IN-VIVO : ESSAIS DE VACCINATION SUR LES LAPINS SPF (Specific-Pathogen Free) AVEC LES PROTEINES RECOMBINANTES DE $\lambda$ Est.R1 et pR1.

**OBJECTIF :** Evaluer in-vivo l'activité immunologique et protectrice de l'antigène Est.R1 contre les infections à coccidie.

Tableau 1 : Niveau de protection exprimé en % de réduction d'oocystes chez les animaux immunisés avec la protéine de fusion Lipoprotéine I.

Parasites	Groupes d'animaux (4 groupes de 06 lapins)	Moyenne d'excrétion d'oocystes/animal	Réduction d'oocystes (%)
<i>Eimeria magna</i>	1: pVUB1/JM109 (contrôle)	$1,86 \times 10^8$	17
	2: Lpp I/Est.R1/JM109 (vaccin)	$1,54 \times 10^8$	
<i>Eimeria intestinalis</i>	3: pVUB1/JM109 (contrôle)	$9,16 \times 10^8$	62
	4: Lpp I/Est.R1/JM109 (vaccin)	$3,50 \times 10^8$	
	5: témoins (non vaccinés, non infectés)	0	

## CONCLUSION

- L'étude sur la caractérisation du gène complet (gDNA ou cDNA) pourrait permettre d'améliorer le pouvoir antigénique de la protéine recombinante dans la protection.