3.1. Diagnostic immunologique

Le parasitisme résulte de l'équilibre établi entre les mécanismes de défense du lapin et les divers moyens d'évasion dont dispose le parasite. L'immuni-diagnostic a pour but de mettre en évidence les réactions de l'hôte-parasite afin de faire la preuve de l'existence du parasite. La réponse immunitaire due à la présence du parasite est complexe à cause de la grande variété antigénique de celui-ci. La nature des antigènes est variable selon la taille, le stade évolutif, l'origine géographique de la souche et même pour une même souche (variantes) **(Pautrizel 1960)**.

3.2. Indications

Le diagnostic immunologique est indiqué dans :

1- Cas ou la mise en évidence du parasite est impossible (difficile).

2- Indispensable dans :

- Les localisations profonds cas d'Amibiase hépatique.
- Les impasses parasitaires (extériorisation impossible du parasite).

* Kyste hydatique.
* Bilharzioses

- Lors des infestations fugaces pouvant être cliniquement muette cas de :

* Toxoplasmose

- Lorsque le parasitisme est intermittent cas des trypanosomiases.
- Dans les infestations chroniques des parasitoses à longue durée d'évolution cas de :

* Filarioses.
* Bilharzioses.

- Suivi thérapeutique pour confirmer une guérison ou dépister précocement une rechute cas de :

* hydatidose
* amibiase Viscérale
* distomatose
* mycose profond

- Dans les enquêtes épidémiologiques

* Soit pratique
* Soit peu juger de la prévalence d'une affection dans un groupe de population afin de pouvoir établir des mesures de lutte efficaces **(Pautrizel 1960)**.

3.2.1. Antigène

3.2.1.1. Définition

Les parasites peuvent être considérés comme des mélanges d'antigènes ou plutôt comme des mosaïques complexe d'antigènes dont un ou quelques-uns uns seulement seront responsables de l'état d'immunité.Tout par définition. Ces Ag devraient conduire à la production d'anticorps décelables en réactions immunologiques (**Haas 1974).**

3.2.1.2. Nature et origine

Les antigènes sont classés en deux groupes **(Pautrizel 1960)**

a. Antigènes homologues

Ce sont des antigènes obtenus soit :

- Par entretien chez les animaux cas de :

* Toxoplasma

* Gandu chez les souris

* Schistosomamansoni chez le mollusque puis chez le rat

- par culture cas de

* Plasmodium falciparum

* Entamoebahistolytica

* Leishmania

* Divers champignons

b. Antigènes hétérologues

Se sont des parasites d'animaux possédant des communautés antigéniques avec les parasites de l'homme cas de :

- Filaire du chien

- Ascaris du porc (**Souici 1997).**

3.2.1.3. Préparation

Pour un parasite donné les antigènes utilisables appartiennent à deux grandes catégories :

-**Les antigènes somatiques :**Ces antigènes sont préparés à partir du parasite à l'un quelconque de ses stades évolutifs. Pour ces antigènes on distingue :

***Les antigènes solubles :** constitués par un extrait solubilisé de parasite.

*** Les antigènes figurés :** Constitués par des parasites entiers, vivants ou non, ou encore par des fragments parasitaires.

- Les antigènes métaboliques : Se sont des antigènes excrétés-sécrétés, libérés par le parasite dans certains formations (exp : kyste hydatique). Ces antigènes sont toujours des antigènes solubles (**Souici 1997).**

a. Préparation de l'antigène soluble

La préparation est très variable suivant les cas :

- Pour les antigènes vermineux, les parasites sont immédiatement après leur récolte lavé a trois reprise dans de sérum physiologique, puis congelés dans le l'eau distillée et lyophilisé. Le broyat obtenu par trituration mécanique à basse température constitue l'antigène brut qui est délipidé de façon à augmenter la spécificité, surtout si cet antigène doit être employé pour la réaction de fixation du complément (**Souici 1997).**

- Pour les antigènes extraits de protozoaires, l'extraction à généralement lieu après éclatement des parasites, soit par une succession de congélation- décongélation, soit par action des ultrasons, la dilapidation n'est pas indispensable (**Souici 1997).**

Ces antigènes, quelles que soient leurs origines, peuvent être ensuite purifiés par différentes méthodes (chromatographie par exemple). Leur conservation est généralement réalisée sous forme lyophilisée (**Souici 1997).**

b. Préparation de l'antigène figuré

Ils sont constitués essentiellement de coupes à congélation en ce qui concerne les helminthes. Des coupes d'une épaisseur de 5 en moyenne sont réalisées à partir d'un ver ou d'un fragment de celui-ci congelé à -20°. Elles sont ensuite déposées sur des lames porte-objet adapté et constitueront le support antigénique de la réaction immunologique (**Souici 1997).**

3.2.2. Techniques utilisées

Les techniques immunologiques utilisées dans le diagnostic des parasitoses et qui reposent sur la recherche d'anticorps dans le sérum sont :

A. Techniques quantitatives

1.Hemagglutination passive [HAP]

a. Principe

Elle consiste à mettre en présence diverse dilution des sérums étudiés et des hématies jouant le rôle de particule inerte à la surface des quelles ont été fixés les antigènes parasitaires solubles (**Souici 1997).**

b. Avantages

- Sa grande sensibilité permet l'utilisation de faibles quantités d'antigènes et la détection de titre élevé d'anticorps.

- Elle est simple, rapide et n'exige aucun matériels particuliers.

Ces avantages expliquent le succès de cette technique sui vient très efficacement compléter les résultats des autres techniques.

c. Inconvénients

- Elle présente un léger manque de reproductibilité et la difficulté qu'il y a parfois à déterminer des résultats (**Souici 1997).**

2.Immuno fluorescence indirecte [IFI]

a. Principe

Mise en évidence la liaison antigène-Anticorps (Ag-AC) par fixation d'une anti-immunoglobuline à la fluorescéine. Elle est effectuée dans deux temps : Le premier temps un contact Ag-AC et le deuxième temps : contact (Ag-AC) avec l'anti-immunoglobuline fluorescer (**Souici 1997).**

b. Avantages

Cette technique est significative pour un taux supérieur ou égal au 1/20 et reste positif de 7 à 12 mois, ce qui fait d'elle une excellente réaction pour suivre l'évolution de la maladie après traitement **[50]**.

c. Inconvénients

Elle présente des inconvénients liés à l'emploi d'un appareillage spécial qui est souvent onéreux, et à la difficulté de certains lecteurs qui, pour des taux lites exposés à des risques d'évaluation subjective (**Souici 1997).**

3. ELISA (Enzyme linkedImmuno Sorbet Assay)

a. Principe

Il s'agit d'une technique « à deux couches » dans laquelle la présence d'anticorps spécifique est révélée par l'emploi d'antiglobuline conjuguée (**Souici 1997).**

L'originalité de cette méthode port deux points

Tout d'abord, le test est réalisé avec des antigènes solubles qui sont directement fixés par absorption sur un support en polystyrène (alvéoles des plaques de microfiltration) (**Souici 1997)**. Par ailleurs, l'antiglobuline sont marquées par couplage avec des enzymes qui son

détectables à des concentrations infinies. Ceci confère à la méthode une sensibilité extrêmement élevée. La présence d'enzymes, en cas de réaction positive est ensuite révélée en présence d'un chromogène, par un substrat, solution normalement incolore mais qui prend une teinte variable suivant les cas, en présence de l'enzyme correspondante (**Souici 1997).**

b. Avantages

Elle permet une étude épidémiologique précise et rapide (**Hamrioui 1990)**

4. Fixation du complément

a. Principe

Certains complexes antigène-anticorps ont la propriété de fixer le complément. Le système révélateur (Globule rouge de mouton) n'est pas hémolysé qu'en présence de complément. Dans un premier temps on mit en présence du complément d'Ag, le sérum à tester supposé contenir des AC. Dans un deuxième temps, en présence de complément on mit des hématies de mouton, le sérum de lapin anti hématies de mouton (contenant des hémolysines).S'il y a une hémolyse donc présence d'AC spécifique dans le sérum étudié (**Souici 1997).**

b. Avantages

Cette réaction est spécifique et elle permet de décelet des taux d'anticorps plus élevé. Et une réaction sérique supérieure ou égale au ½ est considérée comme positive.

Le pourcentage de sensibilité est de 95% **(Pautrizel 1960)** alors il est de 89% retrouvé par Wattre 1978

B. Techniques qualitatives

1.Immuno Diffusion double (selon ouichterlony) [IDD]

a. Principe

Son principe est extrêmement simple il consiste à placer les sérums et les Ag étudies dans les puits circulaires creusés dans une couche de gélose déposé sur lame. Après diffusion apparaissent en cas de réaction positive des arcs de précipités **(Souici 1997).**

b. Inconvénients

Elle est peu sensible dans la mesure où la diffusion des AG et celles des AC s'effectue de façon radiale.

Seul une petite partie de réactifs se rencontre et donne naissance à des arcs de précipités. Ceci explique la sensibilité qui est très inférieure à celle de l'élèctrosynérese ou, orientés sous

l'action de la différence de potentiel des lg et les protéines antigéniques migrent exactement dans la même direction et en sens inverse **(Souici 1997).**

2.Immuno électrophorèse (IEP)

a. Principe

Cette méthode associe successivement sur la même plaque de gélose deux procédés de séparation des molécules :

-D'abord une électrophorésequi permet de séparer les Ag parasitaire qui sont habituellement complexes et comprenant de nombreuses fractions, ces dernières migreront sous l'action d'une différence de potentiel, de leur charge et de l'axe de migration.

-D'autre part une diffusion dans une direction perpendiculaire a celle de la migration électro phorétique fait apparaître des arcs de précipitation formés au point de rencontre de l'anticorps spécifique avec les fractions antigéniques correspondantes.

b. Avantages

Cette réaction est très spécifique, sa spécificité se traduit par l'apparition des arcs caractéristiques.

c. Inconvénients

Cette réaction est peu sensible et sa réalisation est très longue **(Souici 1997)**

3. Elèctrosynérese ou ImmunoDiffusion (IED)

a. Principe

Cette technique correspond à un principe très élégant. Déposer sur un support approprié est dans des conditions précises de force ionique et du PH, les protéines antigéniques d'une part et les immunoglobulines sériques d'autre part migrent en sens inverse sous l'action de courants d'endosmose et d'une différence de potentiel.Cette migration amène très rapidement en contacte des Ag et les AC. Une réaction positive se traduit au niveau du point de rencontre, par des arcs de précipitation qui sont mieux visibles après coloration **(Souici 1997).**

3.3. Immunogénicité

Pour les *Eimeria* du lapin qui sont très immunogènes, une infection primaire confère une solide immunité contre la réinfection. Cependant, malgré la présence d'antigène communs aux différentes espèces parasitaires et la présence de clones lymphocytaires diriges contre ces antigènes ,il n'y a pas d'immunité croisée entre les différentes espèces et parfois même entre 2 souches d'une même espèce. Tous les stades parasitaires sont immunogènes bien que les

stades les plus précoces le soient d'avantages. Ainsi les souches d'Eimeria dites (souches précoces) chez lesquelles les dernières mérogonie disparaissent, sont moins pathogènes mais sont, malgré tout, immunogènes. Lors d'une infection parasitaire, une réponse immunitaire non spécifique, mais également une réponsespécifique à la fois humorale et cellulaire se développent. Il n'est pas toujours facile suivant les modèles parasitaires et animaux, de déterminer la part des différents mécanismes immunologiques dans la protection. Dans la plupart des cas, l'immunité cellulaire semble jouer un rôle prépondérant dans l'acquisition de l'immunité contre les coccidies **(Renaux 2001).**

En terme d'immunité, il est établi de longue date que l'inoculation de coccidies induit l'apparition d'anticorps circulants mais que ceux-ci ne sont pas protecteurs. Ainsi la mère ne transmet aucune immunité protectrice à ses lapereaux. Seule, l'immunité à médiation cellulaire confère une réelle protection. Les travaux les plus récents soulignent le rôle de l'immunité locale **(Renaux 2003, Pakandl 2008)**

Le rôle de l'immunité locale est indiqué. Des chercheurs ont remarqués que suite à une infection par *E.intestinalis*, des lymphocytes CD8+ infiltrent la muqueuse intestinale. Ils pourraient limiter la pénétration des schizogonies dans les cellules et avoir ainsi une importance centrale dans la limitation de l'infection **(Renaux 2003).**

3.4. Transport du parasite dans l'organisme

Chez le lapin, il a été mis en évidence pour au moins 4 espèces d'*Eimeria* que la pénétration du sporozoite a lieu dans le duodénum alors que l'organe cible peut être parfois très éloigné **(Horton, 1967 ; Pakandl et al., 1993 ; Drouet-Viard et al., 1994b ; Pakandl et al., 1995) :** les cellules du GALT et en particulier l'appendice vermiforme, le Sacculus rotundus et les plaques de Peyer pour E. coecicola, l'iléon pour *E. intestinalis.*

Le cycle d'E. coecicola a été bien étudié en microscopie électronique **(Pakandl et al., 1993 et 1996).** Après injection intra duodénale de sporocystes, les sporozoïtes excystent très rapidement et entrent dans les cellules épithéliales du duodénum. Dans les heures qui suivent, ils sont observés dans les cellules lymphoïdes de la lamina propria de ce segment. De l'inoculation jusqu'à 48 heures post-inoculation le nombre de parasites dans le duodénum décroît alors qu'ils apparaissent dans les cellules lymphoïdes du GALT dans lesquelles ils entament leur première mérogonie. Les mérogonies suivantes se déroulent dans les cellules

épithéliales des dômes. L'observation d'une mérogonie dans des cellules lymphoïdes est une particularité d'*E. coecicola* qui n'est retrouvée chez aucune autre espèce du lapin.

Le cycle et la migration d'E. intestinalis ont également été bien étudiés **(Licois et al, 1992 ; Drouet-Viard et al., 1994).** Les sporozoïtes pénètrent dès les 10 premières minutes dans l'épithélium du duodénum ; 6 heures plus tard, un nombre considérable est observé dans la muqueuse iléale tandis que la quantité présente dans la muqueuse duodénale a beaucoup diminué.

Une des différences fondamentales entre les cycles des Eimeria du lapin et ceux du poulet, est la distance parcourue par le sporozoïte de son site de pénétration dans la muqueuse intestinale jusqu'à son site de développement.

3.5. Organisation du système lymphoïde associé aux muqueuses

L'organisation du système lymphoïde chez le lapin est globalement la même que chez les autres mammifères. On distingue les organes lymphoïdes primaires, sièges de la lymphopoïèse et de la maturation des lymphocytes, des organes lymphoïdes secondaires, sièges de leur stimulation et de leur prolifération.

Les organes lymphoïdes primaires sont le thymus, dans lequel se différencient les lymphocytes T, et la moelle osseuse, dans laquelle se différencient les lymphocytes B. La rate, les ganglions lymphatiques et le tissu lymphoïde associé aux muqueuses (MALT) constituent les organes lymphoïdes secondaires.

La plupart des Eimeria du lapin, et en particulier E. coecicola et E. intestinalis, se développant dans l'intestin, nous décrirons plus particulièrement la muqueuse intestinale et le tissu lymphoïde qui lui est associé. L'organisation de la rate et des ganglions mésentériques du lapin est semblable à celle de la plupart des mammifères **(Weinstein et Anderson, 1998).** En revanche, le système lymphoïde associé à la muqueuse intestinale possède une particularité, le développement considérable de l'appendice vermiforme. Cet organe intervient en tant qu'organe lymphoïde primaire dans la production et la maturation des lymphocytes B chez le jeune lapereau et en tant qu'organe lymphoïde secondaire dans l'induction de la réponse immunitaire spécifique. **(Bockman 1983).**

Toutes les muqueuses de l'organisme possèdent un tissu lymphoïde associé : le NALT associé au tractus respiratoire supérieur, le BALT associé au tractus respiratoire profond et le GALT associé au tractus gastro-intestinal et urogénital. Le rôle premier du MALT est d'assurer la défense de l'hôte contre les pathogènes et d'assurer la protection des muqueuses en régulant la réponse inflammatoire.

La muqueuse intestinale constituant la voie d'entrée des Eimeria dans l'organisme et, pour la majorité d'entre elles, le site de développement, nous nous intéresserons donc plus particulièrement à l'organisation du GALT. **(Bockman 1983).**

La muqueuse intestinale est une surface d'échange importante avec le milieu extérieur au niveau de laquelle sont absorbés les nutriments. Elle constitue également une barrière physiologique et immunologique contre un grand nombre de miro-organismes et de substances étrangères. La régulation de la réponse immune dans la muqueuse intestinale est particulièrement complexe. D'une part, la charge antigénique dans l'intestin est importante et des mécanismes de tolérance doivent être induits vis-à-vis de la plupart des antigènes. D'autre part, des mécanismes immunitaires non spécifiques et adaptatifs doivent pouvoir se mettre en place lors de l'invasion par un micro-organisme. Dans des conditions physiologiques normales, un équilibre homéostatique est maintenu et les processus inflammatoires régulés. **(Bockman 1983).**

Plusieurs facteurs non immunologiques permettent d'assurer la défense des muqueuses : la flore saprophyte résidente et les sécrétions digestives créent un environnement défavorable à la croissance des agents pathogènes. Le péristaltisme intestinal, le mucus et le glycocalyx permettent de réduire les interactions entre agents pathogènes et cellules épithéliales. Certaines substances (la lactoferrine, la lactoperoxidase et le lysozyme) peuvent avoir une activité inhibitrice sur le développement des agents pathogènes. Enfin, l'épithélium cohésif et les jonctions étroites entre cellules épithéliales empêchent le passage intercellulaire des agents pathogènes.

Lorsque ces mécanismes ne permettent pas l'élimination de l'agent pathogène, des mécanismes immunitaires de défense peuvent se mettre en place. Le système lymphoïde associé au tube digestif (GALT) contient à lui seul plus de cellules immunitaires que le reste de l'organisme. **(Bockman 1983).**

Le GALT peut être morphologiquement et fonctionnellement divisé en 2 parties :

- Les sites inducteurs de la réponse immunitaire représentés par les plaques de Peyer, l'appendice vermiforme et le Sacculus rotundus qui constituent le tissu lymphoïde organisé.

- Les sites effecteurs de la réponse immunitaire, représentés par le tissu lymphoïde diffus de la lamina propria et par les lymphocytes de l'épithélium intestinal. **(Bockman 1983).**

3.6.Sites inducteurs de la réponse immune mucosale

A la différence de la plupart des mammifères, chez lesquels les sites inducteurs de la réponse immunitaire mucosale sont principalement constitués par les plaques de Peyer, le lapin possède 2 autres structures particulièrement développées, le Sacculus rotundus et l'appendice vermiforme, dans lesquelles la réponse immune peut être induite.

Le tissu lymphoïde de l'appendice vermiforme, du Sacculus rotundus et des plaques de Peyer est constitué de follicules lymphoïdes, surmontés d'un dôme et d'un épithélium spécialisé (épithélium associé aux follicules, FAE), séparés par des zones inter folliculaires **(Figure 09) (Bockman 1983).**

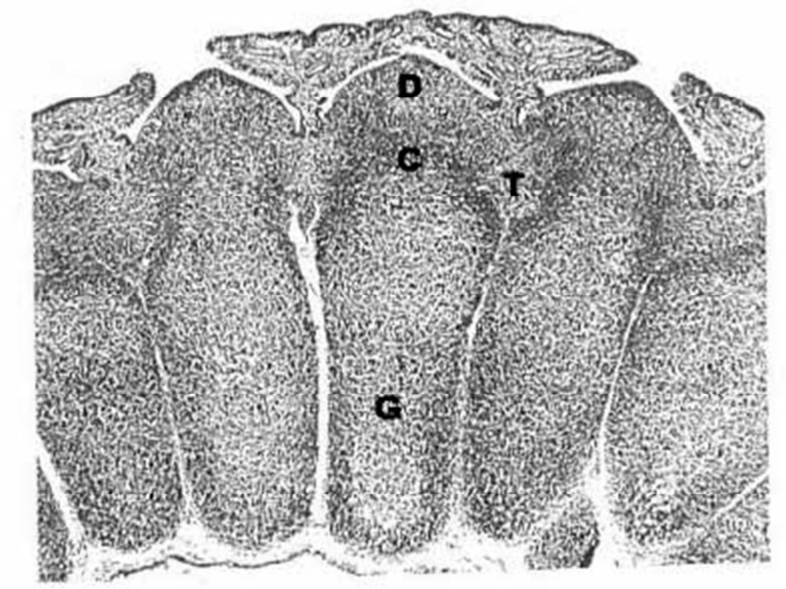


Figure 09 : Coupe histologique d'appendice vermiforme de lapin (d'après Bockman, 1983). D : Dome ; C : Corona ; T : aire thymo-dépendante interfolliculaire ; G : centre germinatif.

Les follicules sont organisés en un centre germinatif et une corona qui contiennent essentiellement des lymphocytes B-IgM+ (Ermak et al., 1994), mais également des macrophages et des lymphocytes T CD4+ (Ermak et al., 1994). Le ratio des lymphocytes IgM+/CD4+ et IgM+/IgA+ diminue dans le dôme qui surplombe la corona (Ermak et al., 1994 ; Weinstein et Anderson, 1998a).

Les zones interfolliculaires constituent les aires T-dépendantes riches en lymphocytes T CD4+ et CD8+ et en macrophages. C'est à ce niveau que pénètrent les lymphocytes sanguins dans la muqueuse.

L'épithélium associé aux follicules est un épithélium très spécialisé qui a été particulièrement bien décrit chez le lapin. Il se différencie de l'épithélium intestinal, par l'absence de cellules à mucus, l'absence de sécrétion du récepteur des IgA dimériques **(Pappo et Owen, 1988)** et d'activité phosphatase alcaline **(Owen et Bhalla, 1983)**, par sa capacité à fixer les lectines **(Neutra et al., 1987)** et par la présence de cellules épithéliales particulières, les cellules M (M pour microfold). Chez le lapin, les cellules M représentent 50% des cellules de l'épithélium associé aux follicules contre seulement 10% chez les rongeurs (**Pappo, 1989).**

Les cellules M se caractérisent par la présence de microvillosités atrophiées et irrégulières ainsi que par un glycocalyx et une couche de mucus clairsemés facilitant l'accès de leur membrane apicale aux antigènes luminaux **(Owen et Jones, 1974).** La membrane basolatérale de ces cellules est profondément invaginée et forme une poche intra-épithéliale dans laquelle viennent se loger des lymphocytes et des macrophages. Les cellules M captent une grande variété d'antigènes et de microorganismes et les rendent accessibles à ces cellules lymphoïdes. Ainsi, des antigènes solubles (**Bockman et Cooper, 1973)** mais également des virus **(Wolf et al., 1981),** des bactéries (**Inman et Cantey, 1984 ; Owen et al., 1986),** des protozoaires **(Marcial et Madara, 1986)** et des microsphères de 10 nm à 10 µm **(Pappo et Ermak, 1989 ; Ermak et al., 1995),** sont susceptibles d'être transportés par ces cellules de la lumière intestinale vers le tissu lymphoïde sous-jacent. L'efficacité du transport semble liée aux capacités d'adhérence des particules à la surface de ces cellules **(Neutra et al., 1987).** Les cellules M du lapin assurent un transport plus efficace que celui des cellules M des rongeurs **(Pappo et Ermak, 1989).** Les antigènes luminaux délivrés aux cellules lymphoïdes présentes

dans la poche intra-épithéliale peuvent être ensuite captés par les cellules présentatrices d'antigènes et acheminés vers les centres germinatifs.

Ermak et al en 1990 Ont montré que les lymphocytes présents dans l'épithélium associé aux follicules possèdent un phénotype particulier. En effet, ces lymphocytes sont très majoritairement CD43+ (65% dans les plaques de Peyer, 95% dans l'appendice), expriment des molécules de classe II du CMH, ainsi que les marqueurs de surface CD18 et CD58, mais sont CD4--CD8--. Ces cellules constituent une population de lymphocytes T activés, différente de celles présentes dans le dôme, dans les aires T-dépendantes, ainsi que dans l'épithélium et la lamina propria des villosités. Il s'agirait en réalité de cellules dendritiques (Weinstein et Anderson, 1998b).

La captation des antigènes par les macrophages ou les cellules dendritiques des dômes et des follicules permet l'activation des lymphocytes et l'induction de la réponse immunitaire spécifique.

L'appendice vermiforme joue non seulement un rôle dans l'induction de la réponse immune mais il constitue également un organe essentiel dans la production des lymphocytes B au cours des premières semaines de la vie du lapereau **(Reynaud et Weill, 1996 ; Pospisil et Mage, 1998).** Ces lymphocytes B, dont la différenciation se fait dans l'appendice au contact de la microflore intestinale **(Fuschiotti et al., 1997 ; Lanning et al., 2000),** migrent secondairement dans le reste de l'intestin et en particulier dans les plaques de Peyer. L'appendice est essentiel à la diversification du répertoire des immunoglobulines et au développement du système immunitaire mucosal (**Dasso et Howell, 1997 ; Vajdy et al., 1998).**

3.7. Sites effecteurs de la réponse immune mucosale

En dehors des tissus lymphoïdes organisés, beaucoup de cellules lymphoïdes sont réparties dans la lamina propria et dans l'épithélium de l'intestin. La réponse immune effectrice peut donc se développer tout le long du tractus intestinal.

Les cellules épithéliales sont constituées principalement de 4 types cellulaires dérivant des cellules souches multipotentes logées dans les cryptes et qui participent à la restauration et au maintien de l'intégrité de l'épithélium **(Gebbers et Laissue, 1989).**

- **Les cellules absorbantes** constituent la majorité des cellules de l'épithélium digestif (90%) et jouent un rôle fondamental dans l'absorption des nutriments.

- **Les cellules de Paneth** sont localisées dans les cryptes et sécrètent des granules riches en lysozyme possédant une forte activité bactériolytique et des peptides antibiotiques tels que la cryptidine.

- **Les cellules à mucus** contribuent à la formation d'une couche protectrice à la surface des entérocytes.

- **Les cellules entéro endocriniennes** relarguent des hormones en réponse aux changements d'environnement au niveau des capillaires du tissu conjonctif.

Toutes ces cellules, hormis les cellules de Paneth, migrent des cryptes vers le sommet des villosités et sont expulsées dans la lumière en 2 à 3 jours.

Les entérocytes qui constituent les cellules absorbantes de l'épithélium intestinal sont également impliqués dans les mécanismes de protection immunitaires. Ces cellules assurent la transcytose des IgA sécrétoires (IgAs) de leur site de synthèse, les plasmocytes de la lamina propria, jusqu'à la lumière intestinale. Des récepteurs aux IgAdimériques sont synthétisés et exprimés dans leur membrane basolatérale ; les complexes récepteur-Ig sont internalisés par endocytose, transportés à travers le cytoplasme et relargués dans la lumière intestinale (Brandtzaeg, 1995). Le clivage du récepteur au pôle apical de la cellule libère la pièce sécrétoire qui masque ainsi les sites de clivage protéolytique sur la molécule d'IgAs (Mostov, 1994). Les IgAs représentent l'isotype prédominant des muqueuses et préviennent l'attachement des microorganismes et antigènes luminaux aux épithéliums (Gebbers et Laissue, 1989). Une des particularités du lapin est qu'il possède 13 gènes fonctionnels différents pour la chaîne C□ des immunoglobulines A, alors que les autres mammifères n'en possèdent qu'un ou deux (Burnett et al., 1989). Les entérocytes expriment également les molécules de classe I et II du CMH et sont capables de produire certaines cytokines.

Les lymphocytes intra-épithéliaux (LIE) sont également une constituante essentielle de l'épithélium intestinal. Ils se localisent au-dessus de la lame basale entre les entérocytes. A leur surface, l'intégrine □$_E$□$_7$permet la fixation à une adressine présente sur les cellules épithéliales, l'E-cadhérine (Cepek et al., 1994). Chez la souris 90% des LIE sont des lymphocytes T et 90% expriment la molécule CD8 (Guy-Grand et Vassalli, 1993). Parmi ces

lymphocytes CD8+, on distingue 2 populations selon la nature homo- ou hétéro- dimérique de la molécule CD8. La population CD8+ porte le récepteur $CD_8\alpha\alpha^+$, est thymo-dépendante et est identique à celle que l'on trouve dans les organes lymphoïdes. La population $CD_8\alpha\alpha^+$est en revanche atypique. Elle représente près de 60% des LIE CD8+, est thymo-indépendante et possède en majorité le récepteur TCR$\gamma\delta$(Guy-Grand et al., 1991 ; Guy-Grand et al., 1996). Ces lymphocytes ont une cytotoxicité non restreinte par les molécules du CMH. La présence de granulations intracytoplasmiques riches en perforine, granzymes et Fas-Ligand atteste de l'activité cytotoxique des LIE (Guy-Grand et al., 1996).

La muqueuse intestinale est constituée, dans sa partie sous-jacente, d'une couche de tissu conjonctif formant le chorion ou lamina propria contenant des cellules musculaires lisses, des fibroblastes, des vaisseaux sanguins et lymphatiques ainsi que des cellules lymphoïdes. Chez la souris, les plasmocytes à IgA constituent en moyenne 40% des cellules de la lamina propria (Spieker-Polet et al., 1999). Les lymphocytes T présents sont essentiellement CD4+ TCR$\alpha\beta$ (Akbar et al., 1988 ; Trout et Lillehoj, 1996) et expriment des marqueurs de cellule mémoire (Akbar et al., 1988).

3.8. Réponse immunitaire de l'hôte contre les Eimeria

Les Eimeria sont des protozoaires parasites monoxènes qui possèdent une grande spécificité d'hôte. De manière générale, et plus particulièrement pour les Eimeria du lapin, une infection primaire confère une solide immunité contre la réinfection **(Rose, 1974 ; Licois et al., 1992b ; Coudert et al., 1993).** Cependant, malgré la présence d'antigènes communs aux différentes espèces parasitaires et la présence de clones lymphocytaires dirigés contre ces antigènes, il n'y a pas d'immunité croisée entre les différentes espèces et parfois même entre 2 souches d'une même espèce **(Coudert et al., 1990 ; Prowse, 1991 ; Licois et al., 1992).** Tous les stades parasitaires sont immunogènes bien que les stades les plus précoces le soient davantage **(McDonald et al., 1988).** Ainsi, les souches d'Eimeria dites 'souches précoces' chez lesquelles les dernières mérogonies disparaissent sont moins pathogènes mais sont, malgré tout, immunogènes **(Shirley et Bellatti, 1984 ; Shirley et al., 1984 ; Licois et al., 1995 ; Drouet-Viard et al., 1997a et 1997b ; Williams et al., 1999).**

Tant chez le poulet que chez le lapin, l'acquisition de l'immunité permet un arrêt du développement du parasite au cours de la réinfection. Les mécanismes mis en jeu semblent dépendre de l'espèce parasitaire. Chez le poulet, l'inhibition de la pénétration dans la

muqueuse n'est constatée que dans certains cas **(Augustine et Danforth, 1986) ;** après pénétration dans la muqueuse intestinale, seuls quelques parasites sont retrouvés au niveau des cryptes. Dans tous les cas leur développement ultérieur est arrêté ; il semblerait que les sporozoïtes restent bloqués dans les lymphocytes assurant leur transport vers les cellules hôtes **(Riley et Fernando, 1988 ; Vervelde et al., 1993 ; Trout et Lillehoj, 1995).**

Lors d'une infection parasitaire, une réponse immunitaire non spécifique mais également une réponse spécifique à la fois humorale et cellulaire se développent. Il n'est pas toujours facile suivant les modèles parasitaires et animaux de déterminer la part des différents mécanismes immunologiques dans la protection. Dans la plupart des cas, l'immunité cellulaire semble jouer un rôle prépondérant dans l'acquisition de l'immunité contre les coccidies.

Chez le lapin, les mécanismes immunitaires mis en jeu au cours de la coccidiose n'ont jamais été étudiés jusqu'à maintenant. La réponse immunitaire contre les *Eimeria* a été étudiée essentiellement chez le poulet ou la souris. Une littérature abondante concernant le développement des mécanismes immunitaires dans d'autres modèles d'infection parasitaire (comme Toxoplasmagondii dans le modèle murin) existe également. Aussi, la plupart des résultats qui suivent feront référence à des mécanismes de résistance contre les infections par les coccidies, élucidés avec le modèle murin ou chez le poulet.

3.8.1. Déclenchement de la réponse immune intestinale

La première barrière rencontrée par les pathogènes à voie d'entrée intestinale dans l'organisme est l'épithélium. Les entérocytes sont les premières cellules sollicitées et pourraient être à l'origine du déclenchement de la réponse immunitaire.

Les entérocytes infectés sont capables de synthétiser des chimiokines et cytokines pro-inflammatoires, comme l'IL-1, l'IL-8, le TNF-α (**Seydel et al., 1997**), qui jouent un rôle dans l'attraction des neutrophiles et des lymphocytes T $CD8^+$ (**Baggiolini et al., 1994 ; Roberts et al., 1997)**. La réponse inflammatoire provoque une surexpression des molécules de classe II du CMH par les entérocytes qui pourraient alors présenter l'antigène aux lymphocytes sous-jacents **(Mayer et al., 1991).** Ces cellules peuvent également participer directement à l'élimination des parasites en induisant la synthèse d'oxyde nitrique (NO), molécule qui possède une large activité anti-microbienne contre les pathogènes intestinaux **(James, 1995 ; Clark et Rockett, 1996 ; Fang, 1997).**

Les macrophages, attirés par certaines chimiokines, notamment le MCP-1, produisent en réponse à leur activation, des cytokines inflammatoires comme le TNF-α, l'IFN-α ou l'IL-1. Ils ont également des fonctions microbicides et microbiostatiques impliquant la production de radicaux libres de l'oxygène (H2O2, OH•, O•,O2•, O2-) **(Nathan et al., 1983)** ou de dérivés nitrés. Il a ainsi été montré, dans le cas d'infections par E. tenella, que l'activation des macrophages par l'IFN-α induit la production de NO et inhibe le développement des parasites in vitro dans des fibroblastes **(Dimier et al., 1998 ; Dimier-Poisson et al., 1999)**. Les macrophages jouent également un rôle important dans l'apprêtement et la présentation des antigènes aux lymphocytes et donc dans la mise en place de l'immunité spécifique.

Les cellules dendritiques, qui peuvent également être attirées par des molécules chimio attractives **(Kelsall et Strober, 1997**), sont capables de présenter les antigènes exogènes, associés aux molécules de classe II du CMH, aux lymphocytes T-CD4+. Chez la souris ce sont essentiellement ces cellules qui jouent le rôle de cellules présentatrices d'antigènes dans les plaques de Peyer. Contrairement aux macrophages, les cellules dendritiques semblent impliquées dans la synthèse précoce d'IL-12 **(Scharton-Kersten et al., 1996)** sans activation préalable par l'IFN-α **(Reis e Sousa et al., 1997 ; Bourguin et al., 1998).**

Les cellules NK interviennent au cours de la phase précoce de l'infection en produisant de l'IFN-α suite à leur activation par l'IL-12 produit par les cellules dendritiques et les macrophages **(Gazzinelli et al., 1994).** L'IFN- permet alors l'activation des fonctions microbicides des macrophages **(Scharton-Kersten et al., 1997),** ainsi que l'induction de la différenciation des cellules T helper en cellules Th1 productrices d'IFN-α.

Les principaux sites inducteurs de la réponse immunitaire sont, chez la souris, les plaques de Peyer. L'orientation naturelle de l'immunité dans ces organes est de type Th2 (production d'IL-4, IL-5 et IL-10) et Th3 (production de TGF) et conduit à un profil cytokinique en faveur de la production d'IgA et de la stimulation de cellules induisant la tolérance orale des antigènes. Lors d'une infection par certains parasites, l'homéostasie est rompue ; le déséquilibre qui se créé entraîne le basculement de la réponse immune vers un profil de type Th1 (production d'IFN-α et d'IL-2) et la production de cytokines inflammatoires.

Les mécanismes immunitaires non spécifiques conduisent à l'activation des lymphocytes et vont déclencher ainsi la mise en place de l'immunité spécifique.

3.8.2. Réponse humorale

La réponse humorale sérique induite par une infection par les Eimeria se caractérise par la production d'anticorps spécifiques de type IgM, IgA et IgG. L'apparition des IgM et des IgA précède celle des IgG mais ne persiste pas. Les IgG sont détectées plus tardivement et leur production est maximale deux à trois semaines après l'infection **(Rose et Mockett, 1983 ; Trees et al., 1985).** Après une réinfection, seule la production d'IgG augmente à nouveau et plus rapidement **(Rose et Mockett, 1983 ; Wakelin et Rose, 1990).**

Dans la muqueuse intestinale, la production d'IgM, d'IgA, et dans certains cas d'IgG, a pu être détectée **(Rose et Mockett, 1983 ; Mockett et Rose, 1986 ; Rothwell et al., 1995 ; Girard et al., 1997).** Des techniques de détection in situ ont montré que les lymphocytes B de la lamina propria porteurs de l'isotype IgA viennent se concentrer au sommet des villosités, directement au contact des cellules infectées **(Nash et Speer, 1988).** Les lymphocytes porteurs de l'isotype IgG restent localisés dans la partie basale de la muqueuse.

In vitro, les anticorps peuvent inhiber la pénétration des stades invasifs du parasite dans les cellules hôtes. Ainsi, les contenus cæcaux riches en IgA, issus d'animaux en cours d'infection par *E. tenella*, sont capables d'inhiber l'invasion des cellules en culture par des sporozoïtes **(Davis et al., 1978 ; Davis et Porter, 1979).** De même, des anticorps monoclonaux dirigés contre des antigènes parasitaires peuvent inhiber la pénétration **(Crane et al., 1988** ; **Ouarzane et al., 1995).** Des sérums provenant de poulets immuns sont aussi capables d'augmenter la phagocytose des sporozoïtes et des mérozoïtes par les macrophages **(Bekhti et Pery, 1989).**

Cependant, in vivo le rôle joué par les anticorps dans la protection reste controversé. En effet, la bursectomie chez le poulet ne supprime pas la résistance des animaux (**Rose et Long, 1970 ; Lillehoj, 1987)** et rares sont les cas où le transfert passif d'anticorps protège les animaux de la coccidiose **(Rose, 1971 ; Wallach et al., 1994).** De même, la déficience de souris en lymphocytes B semble sans implication sur le déroulement de l'infection et l'acquisition de l'immunité **(Kitamura et al., 1991).**

3.8.3. Réponse immune cellulaire

Les mécanismes de protection contre une infection parasitaire passent par une action synergique des deux sous-populations lymphocytaires T CD4+ et T CD8+. Les lymphocytes

CD4+ reconnaissent l'antigène associé aux molécules de classe II du CMH alors que les lymphocytes CD8+ reconnaissent l'antigène associé aux molécules de classe I du CMH. Dans le modèle murin, les lymphocytes CD4+, ou T helper (Th), en fonction du type de cytokines qu'ils produisent au cours d'une infection, vont orienter la réponse vers i/ soit l'immunité à médiation humorale (production de cytokines de type Th2 : IL-4, IL-5 et IL-10) et l'activation des lymphocytes B ii/ soit l'immunité à médiation cellulaire (production de cytokines de type Th1 : IFN-α et IL-2) et l'activation des fonctions cytotoxiques des macrophages et des lymphocytes CD8+. Le rôle joué par l'immunité à médiation cellulaire dans l'acquisition de la résistance aux infections par les Eimeria a été bien étudié dans le modèle murin et chez le poulet.