



## Evaluation de l'innocuité des souches précoces de *Eimeria magna* et de *Eimeria media* issues du Bénin en vue de leur utilisation comme souches vaccinales

Y. AKPO<sup>1\*</sup>, M. T. KPODEKON<sup>1,2</sup>, Y. DJAGO<sup>1</sup>, D. LICOIS<sup>3</sup> et I. A. K. YOUSAO<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Centre Cunicole de Recherche et d'Information (CECURI), 01 BP 2009 Cotonou, Bénin.

<sup>2</sup> Ecole Polytechnique d'Abomey-Calavi - Laboratoire de Recherche en Biologie Appliquée (LARBA), Unité de Recherche Cunicole et Cavicole (URCC), 01 BP 2009 Cotonou, Bénin.

<sup>3</sup> INRA - Tours, Laboratoire de Pathologie du Lapin, BP 37380 Nouzilly, France.

\* Auteur correspondant, E-mail : [yao.akpo@epac.uac.bj](mailto:yao.akpo@epac.uac.bj) ; Tél : (229) 21146807

### RESUME

Les coccidioses constituent un problème sanitaire majeur pour l'élevage cunicole. Une vaccination contre cette maladie à l'aide de souches précoces de *Eimeria* ayant une parfaite innocuité est nécessaire. Pour évaluer cette innocuité, trois lots de 12 lapereaux de  $35 \pm 1$  jours ont été inoculés avec des souches précoces de *Eimeria magna* et *Eimeria media* provenant des lapins élevés au Bénin. Un mélange à parts égales des deux souches a été constitué. Les animaux du lot 1 ont été inoculés *per os* avec ce mélange à la dose de  $5 \times 10^3$  oocystes et ceux du lot 2 ont reçu le même mélange à la dose de  $2,5 \times 10^3$ . Le lot 3 a servi de témoin. Deux semaines après l'inoculation, aucun cas de mortalité et/ou de diarrhée n'a été enregistré ; les témoins ont excrété moins d'oocystes ( $3,2 \times 10^4$  oocystes/g) comparativement aux animaux expérimentaux ( $P < 0,01$ ) du lot 1 ( $10,1 \times 10^6$  oocystes/g) et du lot 2 ( $8,8 \times 10^6$  oocystes/g), confirmant ainsi une bonne multiplication de ces souches. La chute du GMQ des lots inoculés par rapport à celui des témoins est significative ( $P < 0,001$ ) mais reste modérée. Il en résulte que ces souches s'avèrent être de bonnes candidates à un vaccin.

© 2011 International Formulae Group. All rights reserved.

**Mots clés :** Coccidiose, *Eimeria magna*, *Eimeria media*, vaccin, lapin, Bénin.

### INTRODUCTION

Les coccidioses intestinales sont des infections parasitaires causées par des protozoaires du genre *Eimeria* se développant dans l'épithélium de l'intestin grêle et du gros intestin. Elles sont connues comme un problème sanitaire majeur de l'élevage cunicole (De Vos, 1970 ; Cowie-Whitney, 1977).

Au Bénin, cette parasitose est confirmée dans la majorité des élevages

cunicoles (Ahlinco, 1987 ; Kpodékon et al., 1994). Parmi les espèces de coccidies rencontrées, *E. magna* et *E. media* sont les plus fréquentes (Houdonougbo et Hongbété, 1997). Ces espèces sont responsables d'importantes pertes économiques en élevage intensif en raison de la baisse de productivité et des mortalités qu'elles provoquent (Lebas et al., 1996). Pendant plusieurs années, les traitements curatifs et préventifs sont basés essentiellement sur l'utilisation

d'anticoccidiens en continu dans l'aliment ou dans l'eau de boisson. La conséquence de cette pratique est l'apparition dans les élevages des problèmes de chimiorésistance (Peeters et al., 1988 ; Coudert, 1989). Au vu de cette situation, l'utilisation d'autres moyens prophylactiques pour lutter contre les coccidioses est nécessaire. La vaccination semble une alternative puisque la plupart des espèces de coccidies sont fortement immunogènes (Coudert, 1990 ; Coudert, 1994 ; Licois et al., 1994). En effet, une infection primaire protège contre une réinfection par la même espèce. Cette caractéristique rend envisageable le développement d'une méthode d'immunoprophylaxie. Des souches de *Eimeria* dites « précoces » ont été obtenues au laboratoire en sélectionnant, au cours de cycles parasitaires successifs, les premiers oocystes produits après inoculation, jusqu'à obtenir une souche dont la période prépatente est plus courte que celle de la souche d'origine. Ces souches possèdent un pouvoir immunoprotecteur efficace alors que leur pouvoir pathogène est fortement réduit par rapport aux souches sauvages (Licois et al., 1990; Licois et al., 1995). Ces caractéristiques confèrent à ces souches des propriétés de bons candidats vaccins (Drouet-Viard et al., 1995). Ce travail vise à inoculer aux lapins des souches précoces de *E. magna* et *E. media* afin d'évaluer leur virulence et l'excrétion des souches potentiellement vaccinales.

## MATERIEL ET METHODES

### Animaux et constitution des lots

Trente six lapereaux de souche locale ayant  $35 \pm 1$  jours d'âge ont été répartis en trois lots de 12 animaux chacun, à raison de 4 lapereaux par cage, soit 3 cages de 4 lapereaux par lot. Ils ont été élevés dans des cages métalliques de 75 cm x 45 cm x 30 cm. Les animaux ont été nourris *ad libitum* avec un aliment granulé commercial non supplémenté. L'anticoccidien utilisé dans l'élevage est la sulfadiméthoxine 20%. Une semaine avant la vaccination, l'utilisation de cet anticoccidien a été arrêtée.

### Souches vaccinales

Elles ont été constituées avec des souches précoces de *E. magna* et *E. media* obtenues à partir de souches sauvages béninoises, isolées en décembre 2005. Ces souches sont issues de la sélection des premiers oocystes excrétés par le lapin selon la méthode décrite par Licois et al. (1990). Elles ont été obtenues chez des lapins Exempts d'Organismes Pathogènes Spécifiques (EOPS) de l'Institut National de la Recherche Agronomique de Tours (37380, Nouzilly, France) au bout de 7 passages successifs pour *E. magna* et de 9 passages pour *E. media* et conservées à 4 °C dans une solution de bichromate de potassium.

### Modalité de vaccination des lapereaux

La vaccination des animaux a été individuelle. Un mélange à parts égales de deux souches (*E. magna* et *E. media*) a été constitué. Chaque lapereau a reçu par voie orale 500 microlitres de ce mélange à parts égales des deux souches. Les lapereaux du lot 1 ont ainsi reçu chacun une dose de  $5 \times 10^3$  oocystes soit  $2,5 \times 10^3$  de *E. magna* et  $2,5 \times 10^3$  de *E. media*. En ce qui concerne les lapereaux du lot 2, ils ont reçu chacun une dose de  $2,5 \times 10^3$  oocystes. Les lapereaux du lot 3 ont constitué le lot témoin.

### Paramètres mesurés

Afin de suivre l'évolution du poids des lapereaux, des pesées individuelles ont été faites le jour de l'inoculation ainsi que les 3<sup>ème</sup>, 5<sup>ème</sup>, 10<sup>ème</sup> et 14<sup>ème</sup> jours après l'inoculation.

Des contrôles de l'excrétion des coccidies ont été effectués entre le 3<sup>ème</sup> et le 8<sup>ème</sup> jour suivant l'inoculation. Durant cette période, 90% des oocystes peuvent être récupérés.

### Balance et instruments de marquage

Les pesées ont été réalisées avec une balance électronique de marque TERRAILLON<sup>®</sup> d'une portée de 3 kg et d'une sensibilité de 1 g. Les lapereaux ont été

identifiés par la pose de boucles auriculaires numérotées.

### Récolte et analyse des crottes

Les cages ont été munies d'un dispositif de récupération des crottes, constitué par un filet à mailles très fines disposé en dessous de chaque cage. Ce dispositif a été mis en place au 2<sup>ème</sup> jour suivant l'inoculation et les crottes ont été récoltées du 3<sup>ème</sup> au 8<sup>ème</sup> jour. Les crottes des 3<sup>èmes</sup> et 4<sup>èmes</sup> jours ont été mélangées. Il en était de même pour celles des 5<sup>èmes</sup> et 6<sup>èmes</sup> jours, puis des 7<sup>èmes</sup> et 8<sup>èmes</sup> jours.

L'analyse coprologique et le comptage des oocystes ont été effectués selon la méthode de Coudert et al. (1995). Les oocystes excrétés ont été comptés par cage et les résultats exprimés par animal.

### Analyse statistique

Le poids vif des lapereaux et le nombre d'oocystes par gramme de crotte ont été les variables prises en compte dans le traitement des données. La procédure des modèles linéaires généralisés (Proc GLM) du logiciel SAS (Statistical Analysis System, 1989) a été utilisée pour l'analyse de variance. La signification de l'effet de l'inoculation a été déterminée par le test de Fisher. Les moyennes des différents lots ont été comparées par le test de Student.

## RESULTATS

### Virulence et excrétion d'oocystes des souches précoces béninoises

Sur le plan clinique, aucune diarrhée, ni mortalité n'a été enregistrée chez les lapereaux inoculés.

Les oocystes excrétés entre le 3<sup>ème</sup> et le 8<sup>ème</sup> jour par les lapereaux inoculés de même que ceux excrétés par les animaux du lot témoin sont consignés dans le Tableau 1.

Il ressort des résultats sur le comptage d'oocystes effectué, que tous les lapins inoculés ont bien multiplié les souches

vaccinales. La production d'oocystes s'est accrue entre le 3<sup>ème</sup> et le 8<sup>ème</sup> jour après la vaccination ( $P < 0,05$ ). Elle est passée de  $5,1 \times 10^6$  à  $11,0 \times 10^6$  chez les animaux inoculés avec la dose de  $2,5 \times 10^3$  oocystes, alors qu'elle est comprise entre  $5,8 \times 10^6$  et  $15,3 \times 10^6$  chez les lapereaux inoculés avec la dose de  $5 \times 10^3$  oocystes. L'excrétion totale d'oocystes sur la période patente a augmenté avec la dose. Elle est de  $30,3 \times 10^6$  pour les animaux inoculés avec la dose forte contre  $24,6 \times 10^6$  pour ceux ayant reçu la dose faible.

Quant à l'excrétion d'oocystes chez les lapereaux du lot témoin, elle est comprise entre  $1,9 \times 10^4$  et  $4,5 \times 10^4$  avec une production totale de  $9,4 \times 10^4$  oocystes au cours de la même période.

### Croissance des lapereaux

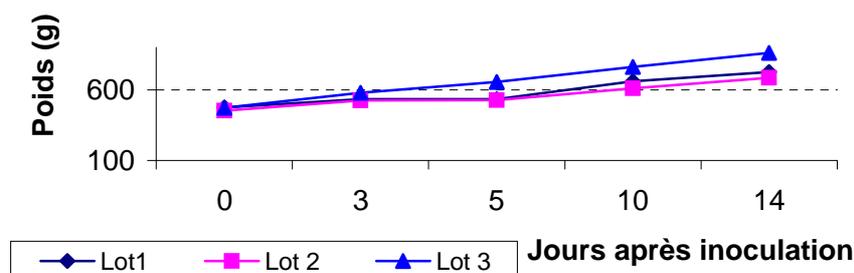
L'évolution du poids des lapereaux est présentée sur la Figure 1. Le jour de l'inoculation, les poids vifs moyens des lapereaux étaient de 474 g, 452 g et 473 g respectivement pour les animaux du lot 1, du lot 2 et du lot 3. Aucune différence significative n'a été observée entre ces poids ( $P > 0,05$ ). Les lapereaux du lot témoin ont connu une croissance régulière au cours des deux semaines avec un poids moyen final de 862 g. Chez les animaux du lot 1 et du lot 2 par contre, une croissance a été observée jusqu'au 3<sup>ème</sup> jour, puis les poids sont restés stationnaires entre le 3<sup>ème</sup> et le 5<sup>ème</sup> jour après inoculation. Malgré la reprise de la croissance des lapereaux des lots expérimentaux après le 5<sup>ème</sup> jour, leurs poids moyens sont restés inférieurs au poids des animaux du lot témoin au bout des deux premières semaines ( $P < 0,05$ ).

Deux semaines après l'inoculation, le gain moyen quotidien (GMQ) des lapereaux du lot témoin était de 27,8 g/jour ; tandis que ceux des lots expérimentaux ont été plus faibles soit 17,9 g/jour pour le lot 1 ; contre 16,6 g/jour pour les lapereaux du lot 2.

**Tableau 1** : Excrétion moyenne d'oocystes.

Dose d'oocystes inoculés	Excrétion d'oocystes (x 10 <sup>4</sup> )			
	J 3,4	J 5,6	J 7,8	Total
Lot 1 : 5 x 10 <sup>3</sup>	5,8 x 10 <sup>6</sup> a	9,2 x 10 <sup>6</sup> a	15,3 x 10 <sup>6</sup> a	30,3 x 10 <sup>6</sup> a
Lot 2 : 2,5 x 10 <sup>3</sup>	5,1 x 10 <sup>6</sup> b	8,5 x 10 <sup>6</sup> b	11,0 x 10 <sup>6</sup> b	24,6 x 10 <sup>6</sup> b
Lot 3 : 0	1,9 x 10 <sup>4</sup> c	3,0 x 10 <sup>4</sup> c	4,5 x 10 <sup>4</sup> c	9,4 x 10 <sup>4</sup> c

Les moyennes de la même période suivies de lettres différentes, diffèrent significativement au seuil de 5%.

**Figure 1** : Evolution du poids des lapereaux après l'inoculation.

**Lot 1** : lapereaux inoculés avec la dose de 5 x 10<sup>3</sup> oocystes ; **lot 2** : lapereaux inoculés avec la dose de 2,5 x 10<sup>3</sup> oocystes ; **lot 3** : lot témoin, non inoculé.

## DISCUSSION

Cet essai visant à évaluer l'innocuité de souches de *Eimeria* potentiellement vaccinales s'inscrit dans un objectif global de lutte contre les coccidioses du lapin au Bénin, basée sur une méthode d'immunoprophylaxie.

Les résultats de cette expérimentation ont montré qu'aucune mortalité ni diarrhée n'a été observée chez les animaux inoculés aux deux doses utilisées. L'absence de diarrhée ou de mortalité est essentiellement liée à une perte de virulence dans la mesure où, à des doses équivalentes, les souches sauvages de *E. magna* et *E. media* peuvent provoquer ces troubles (Coudert et al., 1995). Par ailleurs, selon Coudert (1994), il faudrait administrer des doses de l'ordre de 10<sup>5</sup> à 10<sup>6</sup> oocystes de souches précoces par animal pour qu'un effet pathogène puisse être détecté. Les prises de poids ont permis de noter une légère chute de poids dès le 3<sup>ème</sup> jour. Cette baisse de poids vif est une réponse évidente des lapereaux à l'inoculation. Ce résultat est similaire à l'observation de Licois et al. (1995) sur des lapins inoculés avec une

souche précoce de *E. magna* à une dose de 1x 10<sup>4</sup> oocystes. La même observation avait été faite par Drouet-Viard (1997b) avec 3,5 x 10<sup>3</sup> ou 3,5 x 10<sup>4</sup> oocystes de cette même souche. De même, Licois et al. (1990), indiquent que la souche précoce d'une autre espèce, *E. intestinalis* n'induit qu'une faible réduction de la croissance, pour des doses inférieures à 10<sup>5</sup> oocystes par animal. Toutefois, cette réduction de la croissance est moindre par rapport à celle provoquée par des souches sauvages de *E. media* et de *E. magna* aux mêmes doses (Licois et al., 1994 ; Licois et al., 1995).

Concernant l'excrétion d'oocystes, les résultats montrent que les deux lots de lapereaux inoculés ont excrété des oocystes dans leurs crottes et ce dès J3-J4 post inoculation. Ce résultat indique une sortie précoce des oocystes, comparativement à celle des souches sauvages dont la période prépatente est de 5 jours pour *E. media* et de 7 jours pour *E. magna* (Coudert et al., 1995) d'une part et d'autre part, les souches précoces utilisées sont des oocystes vivants qui ont conservé leur capacité de

multiplication. Cette observation rejoint celles de Licois et al. (1994, 1995) et de Drouet-Viard et al. (1997a). Cependant, l'excrétion totale sur la période patente, qui ne dépasse pas  $3 \times 10^7$ , reste inférieure d'au moins un facteur 10, à celle mentionnée dans la littérature pour les souches sauvages correspondantes (Licois et al., 1994, 1995). Néanmoins, la charge d'oocystes excrétés reste dépendante de la dose d'oocystes inoculés. Les deux doses d'oocystes ( $2,5 \times 10^3$  et  $5 \times 10^3$ ) ont été supportées par les animaux. Ceci traduit l'innocuité des souches vaccinales utilisées.

L'ensemble de ces caractéristiques observées pour les souches précoces issues d'élevages béninois, sont donc similaires à celles rapportées pour les souches précoces isolées en France (Licois et al., 1990, 1994, 1995). Les résultats obtenus confirment que les souches précoces possèdent un pouvoir pathogène atténué et un taux de multiplication réduit, notamment dans les cas de *E. magna* et *E. media*, ce qui en fait de bons candidats pour un vaccin.

### Conclusion

Les souches précoces utilisées n'ont pas été virulentes pour les lapereaux. Elles se sont bien multipliées pour les deux doses utilisées. L'innocuité des souches précoces permet de poursuivre les essais afin de tester leur efficacité par une inoculation d'épreuve avec des souches sauvages pathogènes. Il conviendra aussi de tenir compte de l'âge des lapereaux à la primovaccination qui est un facteur important dans la réponse des animaux. En effet, il est souhaitable de vacciner le plus tôt que possible pour espérer protéger efficacement les animaux tout en sachant que le lapin est réfractaire à la multiplication des coccidies avant 20 jours d'âge et que sa sensibilité à la multiplication du parasite augmente progressivement jusqu'à l'âge de 28-29 jours où elle atteint son maximum. Tout ceci ouvrira des perspectives pour une vaccination de masse sur le terrain.

### REFERENCES

- Ahlinco F. 1987. Les coccidies dans les élevages du département de l'Atlantique : numération et essai d'identification. Mémoire de fin de cycle : Diplôme d'Etudes de Technicien Supérieur, Collège Polytechnique Universitaire, Université d'Abomey-Calavi, Bénin, 27 p.
- Coudert P. 1989. Some peculiarities of rabbit coccidiosis. In Proceedings of the 5<sup>th</sup> International Coccidiosis Conference on Coccidia and intestinal coccidiomorphs, October 17-20, Tours, France, pp. 481-488.
- Coudert P, Licois D, Drouet-Viard F. 1990. *Eimeria* sp du lapin : étude comparative du pouvoir pathogène et immunogène de plusieurs espèces et de plusieurs souches. In Actes 5<sup>ème</sup> Journées de la Recherche Cunicole du 12-13 décembre (Tome I). Paris : 270-277.
- Coudert P. 1994. Potentials of precocious *Eimeria* strains for vaccination of rabbits against coccidiosis. *Cah. Options Méditerran.*, **8**: 501-504.
- Coudert P, Licois D, Drouet-Viard F. 1995. *Eimeria* and *Isospora*. *Eimeria* species and strains of rabbits. In *Biotechnology: Guidelines on Techniques in Coccidiosis Research*. Office for official publications of the European communities: Luxembourg; 52-73.
- Coudert P, Licois D, Drouet-Viard F. 2003. *Pathologie Intestinale du Lapin : Coccidies et Coccidioses*. INRA: Nouzilly; 9 p.
- Cowie-Whitney J. 1977. Disease of the commercial rabbit. *Vet. Rec.*, **101**: 299-30.
- De Vos AJ. 1970. Coccidiosis of rabbits at Onderstepoort. *J. S. Afr. Vet. Ass.*, **41**: 189-194.
- Drouet-Viard F, Coudert P, Licois D, Boivin M. 1995. Vaccination of rabbits against coccidiosis with precocious *Eimeria* lines. *Vet. Res.*, **26**: 216-217.

- Drouet-Viard F, Coudert P, Licois D, Boivin M. 1997 a. Vaccination trial against *Eimeria magna* coccidiosis using a precocious line. *World Rabbit Science*, **5**(2): 51-54.
- Drouet-Viard F, Coudert P, Licois D, Boivin M. 1997 b. Acquired protection of the rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) against coccidiosis using a precocious line of *Eimeria magna*: effect of vaccine dose and age at vaccination. *Vet. Parasitol.*, **69**: 197-201.
- Houndonougbo VP, Hongbété CL. 1997. Détermination de la période d'apparition des premiers oocystes dans les crottes et évolutions périodiques des différentes populations de coccidies dans les élevages cunicoles du Bénin. Mémoire de fin de cycle : Diplôme d'Ingénieur des Travaux, Collège Polytechnique Universitaire, Université d'Abomey-Calavi, Bénin, 47 p.
- Kpodékon M, Adéhan R, Ahlincou F, Coudert P. 1994. Qualitative study of rabbit coccidia in Republic of Benin. *Cah. Options Méditerran.*, **8**: 539-541.
- Lebas F, Coudert P, de Rochambeau H, Thibault R. 1996. *Le lapin: Elevage et Pathologie* (2<sup>ème</sup> éd). Collection FAO: Production et Santé animales, FAO, Rome ; 40-120.
- Licois D, Coudert P, Boivin M, Drouet-Viard F, Provot F. 1990. Selection and characterization of a precocious line of *Eimeria intestinalis*, an intestinal rabbit coccidium. *Parasitol. Res.*, **76** : 192-198.
- Licois D, Coudert P, Drouet-Viard F, Boivin M. 1994. *Eimeria media* : selection and characterization of a precocious line. *Parasitol. Res.*, **80**: 48-52.
- Licois D, Coudert P, Drouet-Viard F, Boivin M. 1995. *Eimeria magna*: Pathogenicity, immunogenicity and selection of a precocious line. *Vet. Parasitol.*, **60**: 27-35.
- Pakandl M, Hlaskova L. 2007. The reproduction of *Eimeria flavescens* and *Eimeria intestinalis* in suckling rabbits. *Parasitol. Res.*, **101**: 1435-1437.
- Peeters JE, Geeroms R, Halen P. 1988. Evolution of coccidial infection in commercial and domestic rabbits between 1982 and 1986. *Vet. Parasitol.*, **29**: 327-331.