

Evaluation de l'immunité humorale consécutive à la vaccination avec Dervaximyo SG33 chez des lapines reproductrices vaccinées à différents stades du cycle productif

B. LE NORMAND¹, S. CHATELLIER¹, I. DEVAUD², A. DELVECCHIO², A. LAVAZZA³, L. CAPUCCI³

1. SCP Fouqué-Gounot-Le Normand-Le Page-Donon, Clinique Vétérinaire des Marches de Bretagne, 35460 St Brice en Coglès
2. Merial SAS 69000 LYON
3. OIE Reference Laboratory for Myxomatosis, Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna (IZSLER), Via Bianchi 7/9, 25124 Brescia, Italie

Résumé : Des lapines multipares d'âges différents ont reçu un rappel vaccinal Dervaximyo SG 33® à différents moments du stade de production selon les lapines. Des prises de sang ont été réalisées pour déterminer une cinétique en anticorps avant et après vaccination. L'étude des variations de titre ELISA myxomatose a permis de montrer que les lapines qui reçoivent un rappel vaccinal après une mise-bas et une insémination artificielle ont une diminution significative de leur titre: elles ont subi deux phases majeures de stress préjudiciable à une mise en place correcte de l'immunité post vaccinale. En parallèle, la réalisation de cinétique ELISA myxomatose sur de jeunes lapines « naïves » a permis d'exclure tout passage de virus sauvage dans l'élevage au cours de l'étude.

Abstract: Evaluation of humoral immunity after vaccination with Dervaximyo SG33® at different states of the production cycle in rabbit does. Multiparous does of different ages received a vaccinal booster Dervaximyo SG 33 ® at various moments of breeding cycle. Blood samples were analyzed by ELISA for myxomatosis antibodies kinetics before and after vaccination. The study reveals that the does which receive a vaccinal booster after parturition and artificial insemination show a significant decrease in antibodies titers: they have to deal with two major stressful steps which is negative for optimal post-vaccinal immunity. Also, ELISA for myxomatosis carried out on young "vaccine-naïve" does allowed to exclude any viral infection in the breeding during the study.

Introduction

L'efficacité d'une vaccination est liée à la qualité de l'immunité qu'elle induit. Cette qualité repose sur la réactivité et l'activité du système immunitaire au moment de la vaccination. En élevage, les vaccinations sont souvent réalisées au moment où l'éleveur a le plus de temps et en dehors des périodes réputées les plus sensibles (semaine précédant et suivant l'insémination artificielle [IA]). Néanmoins, aucune étude n'a été conduite sur le développement de l'immunité post vaccinale selon le moment de la vaccination durant le cycle de production ; nous avons souhaité approfondir ce point concernant la vaccination contre la myxomatose (Dervaximyo SG33®, voie intra-dermique).

1. Matériel et méthodes

L'étude est menée dans un élevage rationnel peuplé de lapines conduites sur un cycle de 42 j, logées en salles transversales et identifiées individuellement par tatouage. Chaque salle est occupée par 2 bandes de lapines inséminées à 1 semaine d'intervalle.

Dans cet élevage, le programme vaccinal contre la myxomatose est le suivant : Dervaximyo SG33®, primovaccination en 2 injections espacées de 6 semaines d'intervalle, la première intervenant à 11 semaines d'âge, puis rappels tous les 3 à 4 mois.

1.1. Animaux

Les lapines subissent une analyse sérologique préalable pour vérifier l'homogénéité des trois groupes qui sont ensuite constitués et éliminer de l'étude les lapines qui ont un taux extrême d'anticorps (très faible ou très élevé).

3 lots de lapines sont constitués : chaque lot subit une prise de sang et une vaccination le même jour, puis une seconde prise de sang 19 jours après ; les 3 lots sont vaccinés à des moments différents du cycle de reproduction. Le schéma chronologique du protocole est le suivant pour les 3 lots V2, V25 et V39 (mise-bas-MB, insémination-IA, palpation-P), avec le jour de l'intervention vaccinale en gras :

	MB1	IA1	P1	MB2	IA2
V2	----	J2 -----	J21		
V25	-----		J25 -----	J2	
V39	-----			J39 -----	J16

Ainsi, le groupe V2 est prélevé et vacciné après la mise-bas (MB1) à J2, et l'IA (IA1) est réalisée entre la vaccination et la seconde sérologie (J21). Le groupe V25 est prélevé et vacciné au moment des palpations à J25, soit après les IA (IA1), mais les mises-bas (MB2) interviennent entre la vaccination et la seconde sérologie (J2 du cycle suivant). Le groupe V39 est prélevé et vacciné après le sevrage à J39, et la mise-bas (MB2) ainsi que l'IA (IA2) se produisent entre la

vaccination et la seconde sérologie (J16 du cycle suivant).

Dans chaque groupe, des lapines nullipares non vaccinées (jeunes lapines futures reproductrices âgées de 5 à 12 semaines) sont incluses pour vérifier l'absence de passage viral sauvage dans l'élevage au cours de l'étude. Elles sont choisies au hasard parmi les animaux de pré-cheptel faisant un poids normal. Les lapines primipares et multipares choisies sont des lapines n'extériorisant aucun signe clinique.

Les jeunes lapines âgées de 5 à 12 semaines et qui ont été vaccinées par nos soins 2 fois à 6 semaines d'intervalle comme prévu au protocole d'AMM du Dervaximyxo SG33, ont fait l'objet d'une cinétique en anticorps.

Les lapines multipares sont en 2^{ème}, 3^{ème} ou 4^{ème} cycle de production. Le but étant de pouvoir visualiser l'effet du cycle de la lapine sur la réponse immunitaire, toutes les lapines non gravides sont retirées de l'étude.

1.2. Prélèvements et analyses

Les prises de sang sont effectuées sur tube sec par ponction jugulaire ; les centrifugations et conservations sont réalisées par le laboratoire départemental Isae 35 (35133 Javené).

Les analyses sérologiques sont réalisées par le laboratoire de référence OIE (Pr Capucci et Lavazza, IZSLER de Brescia, Italie) par technique Elisa compétition Myxomatose avec anticorps monoclonaux (Botti *et al.*, 2007 ; Lavazza *et al.*, 2014). Cette technique cElisa utilise comme antigène une protéine majeure de l'enveloppe de la forme IMV (Virus Mature Intracellulaire) codée par l'ORF M071L ; les anticorps monoclonaux (Mab 1E5) sont dirigés spécifiquement contre la protéine d'enveloppe de la forme IMV.

Les sérums (dilués 4 fois avec une première dilution à 1/10^{ème}) sont incubés avec des virus sous la forme IMV dans des cupules adsorbées avec un sérum anti-Myxoma virus hyperimmun de lapin. Pour les sérums négatifs, tous les IMV se lient aux anticorps adsorbés de la cupule et la densité optique (D.O.) obtenue est de 1,2. Si le sérum contient des anticorps anti-Myxoma virus, ceux-ci se lient plus rapidement aux IMV, et la liaison entre IMV et anticorps adsorbés sur la cupule est moindre : il en résulte une diminution de la D.O. Les titres sont déterminés par le laboratoire de référence (Lavazza *et al.*, 2014).

Les analyses sérologiques préalables sont appelées Elisa 1.

Les analyses sérologiques du jour de la vaccination sont appelées Elisa 2.

Les analyses sérologiques 19 jours après vaccination sont appelées Elisa 3.

1.3. Enregistrements

Les performances de reproduction des lapines prélevées (nombre de mises-bas, nés vifs, nés morts)

sont enregistrées pour chaque lapine. Tout évènement sanitaire est noté individuellement. Les températures d'ambiance des salles d'élevage sont relevées quotidiennement.

1.4. Analyse statistique

Les données brutes ont été triées afin d'éliminer les lapines inexploitable : mortes et réformées.

Les résultats sérologiques sont analysés statistiquement : analyse de la distribution des populations (test de Shapiro et Wilk), analyse des variances pour la mesure de l'effet bande (test de Fisher), analyse des données appariées pour l'étude de l'évolution des titres (test de Student jumelé).

2. Résultats

2.1. Résultats des sérologies Elisa 1

Les 20 lapines nullipares non vaccinées de 10 semaines sont toutes négatives. Ceci permet de valider la possibilité de l'étude par absence de circulation virale sauvage dans l'élevage.

10 lapines multipares correctement vaccinées (selon le programme vaccinal prévu) sont négatives : 8 lapines avaient reçu au total 3 injections de vaccin et 2 lapines avaient reçu 2 injections de vaccin. Ces lapines ne sont pas retenues pour l'étude car suspectes d'avoir eu un « raté » d'injection au cours de leur programme vaccinal.

92 lapines multipares correctement vaccinées (selon le programme vaccinal prévu) présentent des titres (log₁₀) en anticorps variant de 1 à 3,09, avec une moyenne arithmétique de 2,52. L'hétérogénéité des titres, sans corrélation avec les résultats cliniques et virologiques après épreuve, est un élément bien connu dans la myxomatose (Bonlieu, 2008). La protection contre la myxomatose est essentiellement liée à l'immunité à médiation cellulaire, le rôle des anticorps étant secondaire.

Les lapines sont ensuite réparties dans les trois groupes ; le test statistique de Shapiro-Wilk démontre une distribution normale des titres dans chaque groupe.

2.2. Résultats des sérologies Elisa 2 et Elisa 3

Après élimination des lapines mortes, réformées ou non gravides, ainsi que des lapines multipares n'objectivant pas une séroconversion, le nombre de lapines multipares dont les résultats sont exploitables se distribue dans chaque groupe selon le tableau 1.

Tableau 1. Répartition des lapines multipares dans chaque groupe

	Bande 1	Bande 2	Total
V2	13	11	24
V25	11	11	22
V39	13	15	28

Les nullipares non vaccinées de 5,7 ou 9 semaines prélevées au fur et à mesure de l'avancée du protocole, le même jour que les lapines multipares des différents groupes (7 nullipares dans chaque groupe) ont toutes des sérologies négatives.

Sur les multipares, l'évolution du titre en anticorps est peu importante (tableau 2).

Tableau 2. Titres (\log_{10}) des lapines multipares le jour de la vaccination (Elisa 2) et 19 jours après (Elisa 3).

	Moyenne Titre (\log_{10})		
	Elisa 2	Elisa 3	
V2	2,09	2,05	
V25	2,07	2,07	
V39	2,15	2,00	
	Variance Titre (\log_{10})		
	V2	0,314	0,244
	V25	0,299	0,222
	V39	0,376	0,309

Sur les très jeunes lapines vaccinées par nos soins, l'étude des titres en anticorps (tableaux 3 et 4) semble montrer une légère amélioration de la réponse sérologique selon l'âge au moment de la vaccination.

Tableau 3. Titres sérologiques (\log_{10}) après une seule injection vaccinale des jeunes lapines selon l'âge à la première vaccination

Age à la première injection	Nombre	% positives après PV1	Titre moyen après PV1
5 ou 7	14	64%	1,31
9 ou 12	13	77%	1,63

Tableau 4. Titres sérologiques (\log_{10}) après deux injections vaccinales des jeunes lapines selon l'âge à la première vaccination

Age à la première injection	Nombre	% positives après PV2 (% positives après PV1)	Titre moyen après PV2 (Titre moyen après PV1)
5 ou 6	15	60% (40%)	1,64 (1,06)
9	6	100% (67%)	2,61 (1,92)

2.3. Résultats des lapines multipares négatives au départ

Toutes les lapines multipares vaccinées au moins 2 fois et présentant une sérologie de départ négative ont été éliminées de l'étude ; ces 10 lapines ont cependant fait l'objet d'une étude sérologique après une vaccination par nos soins afin d'essayer de

comprendre la cause de cette absence de réponse humorale.

4 lapines restent négatives : 1 après 3 vaccins, 3 après 4 vaccins.

6 lapines se positivent avec des titres très variables après 3 (2 lapines) ou 4 (4 lapines) injections vaccinales.

2.4. Analyse statistique

L'analyse statistique des résultats sérologiques Elisa 2 et Elisa 3 (test de Fisher de comparaison des variances) montre qu'il y a une absence d'effet bande au sein de chacun des groupes V2, V25 et V39 : les résultats des deux bandes sont donc regroupés en un seul et même groupe pour V2, V25 et V39.

Pour les 3 groupes, les moyennes arithmétiques des titres Elisa 2 (\log_{10}) sont très proches et le coefficient de variation est faible (inférieur à 30%) : les 3 groupes de départ étaient homogènes le jour de la vaccination.

L'évolution du titre en anticorps est significativement différente entre Elisa 2 et Elisa 3 pour le groupe V39 dans le sens d'une diminution ($p=0,001$). L'évolution du titre en anticorps n'est pas significativement différente pour les groupes V2 et V25.

3. Discussion

Les résultats des analyses sérologiques effectuées sur les lapines non vaccinées, durant la phase préalable et durant toute la phase d'étude, permettent de conclure à l'absence de circulation de virus sauvage avant et pendant l'étude. Ainsi, la sérologie myxomatose sur lapines non vaccinées est une analyse très intéressante car elle peut permettre d'évaluer le statut sanitaire vis-à-vis de la myxomatose et savoir si le virus sauvage a circulé ou non dans l'élevage, même à très bas bruit (évolution enzootique sub-clinique de la maladie).

Les jeunes lapines vaccinées pour la première fois montrent une meilleure réponse humorale si elles sont injectées plus tardivement : ce résultat démontre une meilleure capacité à potentiellement synthétiser des anticorps neutralisants ; ceci est à mettre en relation avec la décline des anticorps d'origine maternelle (Bonlieu, 2008) mais ne préjuge en rien de la protection de l'animal.

Certaines lapines ne semblent pas présenter de réaction immunitaire humorale ; l'absence de production d'anticorps suite à la vaccination évoque soit un empêchement de la réaction humorale par l'effet anti-inflammatoire des protéines virales vaccinales, soit un état réfractaire de l'animal. La protection contre la myxomatose est liée à l'immunité cellulaire, la production d'anticorps n'est donc qu'un facteur indirect d'étude de la réponse immunitaire et ne reflète pas le niveau de protection de l'animal. Cependant, ces résultats montrent que l'analyse Elisa myxomatose doit être considérée comme une analyse de troupeau et non une analyse individuelle.

La différence significative du titre en anticorps est observée uniquement pour le groupe V39, avec une baisse des titres. Cette différence de faible amplitude peut être liée à une déficience immunitaire en relation avec des périodes du cycle intervenant entre J39, moment de la vaccination et de l'Elisa 2, et J16 du cycle suivant, moment de la sérologie Elisa 3. En effet le groupe V39 est le seul qui est vacciné juste avant la mise-bas et qui est prélevé juste après IA, deux moments du cycle propices à une déficience immunitaire : la rupture immunitaire physiologique de la mise-bas et le stress de la manipulation lors de l'IA, au cours de laquelle la consommation d'eau chute (Le Normand *et al.*, 2011). Les deux autres groupes, V2 et V25, n'ont pas ce cumul de périodes de rupture immunitaire (V2 : IA, V25 : mise-bas).

Conclusion

Cette étude montre l'intérêt d'un test Elisa pour écarter une éventuelle circulation virale sauvage dans un troupeau : les analyses sérologiques effectuées sur animaux non vaccinés permettent de visualiser une non réponse humorale, en prenant la précaution de prendre les animaux de plus de 5-6 semaines d'âge afin d'éviter une interférence avec les anticorps maternels.

L'approfondissement des réponses humorales sur les lapines multipares vaccinées mais sérologiquement négatives, montre que cette analyse doit se concevoir comme une analyse de troupeau.

Les jeunes animaux montrent des réponses humorales meilleures quand ils sont vaccinés plus tardivement vers 9-10 semaines ; cet élément confirme le développement des capacités immunitaires dans ces âges. Il est nécessaire d'avoir des éléments d'étude sur les facteurs pouvant moduler ce développement immunitaire pour les jeunes lapines futures reproductrices afin de pouvoir progresser sur l'état sanitaire du troupeau de reproducteurs.

Enfin, l'intervention de la vaccination juste avant deux phases du cycle susceptibles de créer les plus grosses ruptures immunitaires (mise-bas et IA) semble à déconseiller. La vaccination juste après mise-bas (groupe V2) ou au moment des palpations (V25) ne semble pas interférer avec la réponse humorale.

Cette explication mérite d'être confirmée ; en effet, ce type d'étude permettrait d'améliorer notre connaissance des événements conduisant à une moindre immunité chez l'animal et progresser vers l'élevage de précision.

Remerciements

Les auteurs tiennent à remercier chaleureusement Pr Stéphane Bertagnoli pour ses précieux et bienveillants conseils.

Références

- BONLIEU S., 2008. Etude la protection virologique induite par la vaccination contre la myxomatose chez le lapin européen. Thèse Doctorat Vétérinaire, Toulouse.
- BOTTI G., LAVAZZA A., CRISTONI S., BROCCHI E., CAPUCCI L. Sviluppo e standardizzazione di un test elisa per la sierologia della mixomatosi. Atti Giornate di Coniglicoltura ASIC 2007, p 139.
- LAVAZZA A., CAVADINI P. CAPUCCI L. Chapter 2.6.1. "Myxomatosis" (NB: version adopted in May 2014) in "Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals". 7° edizione. OIE, Paris, France.
- LAVAZZA A., GRAZIANI M., TRANQUILLO V.M., BOTTI G., PALOTTA C., CERIOLI M., CAPUCCI L., 2004. Serological evaluation of the immunity induced in commercial rabbits by vaccination for myxomatosis and R HD. 8th World Rabbit Congress, Puebla, Mexico.
- LE NORMAND B., CHATELLIER S. CHEHRI X., DUQUENNOY P., BIDAUD O., 2011. Consommations d'eau instantanées journalières en élevage cynicole : conséquences thérapeutiques lors des traitements par l'eau de boisson. 14^{èmes} Journ. Rech. Cunicole, Le Mans.