



HAL
open science

Eimeria tenella et Eimeria acervulina : une stimulation antigénique in vitro des cellules provenant de poulets immuns induit le transfert adoptif de la protection contre les coccidioses aviaires

A. Rhalem, H. Sahibi, M. Kazanji, Fabrice Laurent, B. Berrag, P. Pery

► To cite this version:

A. Rhalem, H. Sahibi, M. Kazanji, Fabrice Laurent, B. Berrag, et al.. Eimeria tenella et Eimeria acervulina : une stimulation antigénique in vitro des cellules provenant de poulets immuns induit le transfert adoptif de la protection contre les coccidioses aviaires. *Veterinary Research*, 1993, 24, pp.408-416. hal-02712218

HAL Id: hal-02712218

<https://hal.inrae.fr/hal-02712218>

Submitted on 1 Jun 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

***Eimeria tenella* et *Eimeria acervulina* :
une stimulation antigénique *in vitro* des cellules
provenant de poulets immuns
induit le transfert adoptif de la protection
contre les coccidioses aviaires**

A Rhalem ¹, H Sahibi ¹, M Kazanji ², F Laurent ²,
B Berrag ¹, P Péry ^{2*}

¹ Institut agronomique et vétérinaire Hassan-II (IAV), Département de parasitologie
et maladies parasitaires, BP 6202 Rabat-Instituts, Rabat, Maroc;

² Centre de recherches de Jouy-en-Josas, Unité de virologie et immunologie moléculaires,
domaine de Vilvert, 78350 Jouy-en-Josas, France

(Reçu le 20 novembre 1992; accepté le 18 juin 1993)

Résumé — Le transfert de 5×10^7 cellules ou 10^8 cellules de rates de poulets immuns contre *E tenella* stimulées pendant au moins 12 h *in vitro* par des antigènes totaux d'oocystes de la coccidie leur confère une protection contre une infection ultérieure par le parasite. Au jour 7 après l'infection par 20 000 oocystes, le nombre d'oocystes récoltés dans les caeca est de $(1,33 \pm 1,10) \times 10^6$ chez les receveurs de 5×10^7 cellules immunes restimulées pendant 20 h alors qu'elle est de $(4,64 \pm 2,85) \times 10^6$ chez les receveurs de cellules normales stimulées (soit 85% de protection). Lors d'expériences de transfert de cellules de poulets immuns contre *E tenella* ou contre *E acervulina*, une asymétrie a été mise en évidence dans la protection croisée obtenue, les cellules de poulets immuns contre *E acervulina* transférant une protection contre une infection par *E acervulina* (78%), mais aussi contre une infection par *E tenella* (68%) alors que des cellules de poulets immuns contre *E tenella* ne transfèrent une protection notable (70%) que contre l'infection homologue. L'antigène homologue permet toujours la meilleure stimulation, mais des antigènes de surface communs aux deux coccidies purifiés à partir de sporozoïtes d'*E tenella* à l'aide d'anticorps de la bile anti-*E acervulina* sont capables de stimuler les 2 types de cellules sans en changer les propriétés.

transfert adoptif / cellules immunes / stimulation *in vitro* / coccidies / protection croisée

Summary — *Eimeria tenella* and *Eimeria acervulina*: induction of adoptive transfer of protection against avian coccidiosis by *in vitro* antigenic stimulation of cells from immune chickens. The transfer of 5×10^7 or 10^8 spleen cells from *E tenella*-infected chickens to virgin animals after 12–20-h *in vitro* stimulation with whole sporozoite homogenates confers significant protection to

* Correspondance et tirés à part

recipients. The oocyst contents of ceca on d 7 post-infection with 20 000 *E. tenella* oocysts were $(1.33 \pm 1.10) \times 10^6$ in chickens which received 5×10^7 immune cells after 20-h *in vitro* stimulation and $(4.64 \pm 2.85) \times 10^6$ in chickens receiving 5×10^7 stimulated cells from normal chickens (85% protection). Adoptive transfer by spleen cells revealed an asymmetric cross-protection between *E. tenella* and *E. acervulina*. Spleen cells from *E. tenella* immune chickens protected only against a subsequent infection with the same parasite, while spleen cells from *E. acervulina* immune chickens protected against infection with *E. acervulina* (78%) but also against infection with *E. tenella* (68% protection). The common antigen permits better stimulation, but common surface sporozoite antigens purified from *E. tenella* sporozoites via anti-*E. acervulina* biliary antibodies are capable of stimulating both types of cells without, however, changing their properties.

adoptive transfer / immune cell / in vitro stimulation / coccidia / cross-protection

INTRODUCTION

Les coccidioses aviaires sont provoquées par des protozoaires, parasites du tube digestif, appartenant à différentes espèces du genre *Eimeria* (Reid, 1975). L'immunité spécifique acquise se manifeste par une réduction de l'effet pathogène (mortalité, lésions, mauvais indices de conversion de l'aliment, perte de gain de poids selon les espèces de coccidies envisagées) et une diminution de la production d'oocystes lors de réinfections. Cette diminution de l'effet pathogène variable selon l'immunogénicité des espèces peut devenir complète après plusieurs infections. Les mécanismes effecteurs de la protection induite par l'infection ou par l'administration d'extraits de parasites ne sont connus que de façon très incomplète (Rose, 1987). Les anticorps produits au niveau local (IgA) semblent jouer un rôle important dans la neutralisation des sporozoïtes (Davies et Porter, 1979; Trees *et al.*, 1989), mais un certain nombre d'études récentes suggèrent fortement l'intervention d'une composition cellulaire dans la résistance (Lillehoj, 1987; Rose, 1987), une protection contre des coccidies chez le poulet ayant été obtenue par injection de lymphokines sécrétées par des lymphocytes T (Lillehoj *et al.*, 1989). Aucune étude de transfert de la protection utilisant des cellules immunes stimulées n'a cependant été rapportée chez la vo-

laille. Les expériences présentées dans cet article démontrent qu'un transfert adoptif de la protection peut être induit par une stimulation *in vitro* des cellules de poulets immuns par des antigènes de sporozoïtes, stade parasitaire connu pour avoir des protéines vaccinales (Danforth, 1983; Murray *et al.*, 1986; Rhalem *et al.*, 1989a). Les interactions croisées ont été également étudiées entre *E. tenella* et *E. acervulina*.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Parasites

Le cycle des parasites *E. tenella* (souche de l'Institut agronomique et vétérinaire, Hassan-II, Rabat, Maroc) et *E. acervulina* (souche PAPA 46, Nouzilly, France) a été entretenu au laboratoire par infection de poulets Hybro (Euribrid, Pays-Bas). La purification des oocystes, l'excystation des sporozoïtes et leur purification ont été effectuées selon des techniques courantes (Bontemps et Yvoré, 1974).

Préparation des antigènes

Des sporozoïtes fraîchement excystés d'*E. tenella* ont été soniqués dans un milieu contenant du tampon Tris-HCl 10 mM pH 7,4 additionné de NaCl 0,15 M, de Triton X-100 1% et de phénylméthylsulfonyl fluoride 1 mM. Le surnageant ob-

tenu après centrifugation et contenant les antigènes solubilisés a été traité par 4 fois son volume de méthanol pour enlever le détergent. Le culot de centrifugation (1 500 g, 15 min) a été repris dans de l'eau distillée, dialysé et conservé à -20°C (Ag brut). D'autres sporozoïtes ont été agités pendant 15 min à 37°C dans le tampon ci-dessus additionné de dodecyl sulfate de sodium (0,5%), de déoxycholate de sodium (0,5%) et d'EDTA (acide éthylène diamine tetra acétique) (1 mM). Les sporozoïtes encore intacts (80%) ont été retirés par centrifugation et les antigènes de surface contenus dans le surnageant (Rhalem *et al*, 1989a) ont été traités par la méthode d'Henderson *et al* (1979) pour éliminer les détergents. Ces antigènes ont ensuite été conservés à -20°C (Ag de surface).

Les protéines contenues dans les 2 types de préparations antigéniques ont été dosées par la technique de Bradford (1976) en utilisant une gamme de sérumbumine bovine pour référence.

Purification d'antigènes de surface communs à *E tenella* par des anticorps dirigés contre des antigènes d'*E acervulina*

Le contenu de la vésicule biliaire a été récupéré chez des poulets sacrifiés du jour 7 au jour 11 de leur troisième infection par *E acervulina* ($2,4 \times 10^4$ oocystes à chaque infection). Les échantillons contenant des anticorps ont été traités par du sulfate d'ammonium à 45% de saturation et les anticorps récupérés dans le précipité. La préparation de l'immunoabsorbant et les étapes de purification des antigènes de surface d'*E tenella* ont été réalisées selon des techniques décrites (Rhalem *et al*, 1993).

Stimulation antigénique et transfert des cellules immunes

Les cellules de rates de poulets immuns ont été prélevées le 9^e jour après la 2^e infection sur des poulets infectés à 2 reprises, à 4 semaines d'intervalle, avec un nombre identique d'oocystes d'*E tenella* (3×10^4) ou d'*E acervulina* ($2,5 \times 10^4$). Les cellules provenant d'animaux infectés

par la même espèce de coccidie ont été mélangées et mises en culture pendant des temps variables (tableau I) en absence ou en présence d'Ag brut ($50 \mu\text{g}$ pour 10^7 cellules). Après la culture, les cellules ont été lavées et comptées puis injectées à des poulets vierges selon un procédé déjà décrit (Rhalem *et al*, 1989b).

Infections

Les poulets receveurs âgés de 4 semaines (6 à chaque fois) ont été infectés dans tous les cas par 2×10^4 oocystes, 6 h après le transfert de cellules.

Tests statistiques

Les données (nombre d'oocystes présents dans les caeca au jour 7 après infection par *E tenella* et dans l'intestin au jour 6 après infection par *E acervulina*) ont été traitées par un test *t* de Student.

Pourcentage de protection

Le pourcentage de protection a été calculé à partir des résultats précédents par la formule :

$$100 - 100 \times \frac{\text{nombre d'oocystes chez les receveurs de cellules stimulées}}{\text{nombre d'oocystes chez les receveurs de cellules non stimulées}}$$

(Rose, Mockett, 1983).

RÉSULTATS

Transfert de l'immunité par des cellules de rates de poulets immuns stimulées in vitro (tableaux I et II)

L'effet protecteur des cellules provenant de poulets immuns contre *E tenella* varie avec

Tableau I. Effet d'une stimulation *in vitro* de cellules de rates de poulets immuns par des antigènes totaux de sporozoïtes d'*E. tenella* (50 µg/10⁷ cellules) dans le transfert de l'immunité contre ce parasite.

Nature et nombre des cellules transférées	Nombre de poulets receveurs	Durée de stimulation <i>in vitro</i> (h)			
		0	4	12	20
Nombre d'oocystes (x 10 ⁶) présents dans les caeca au J7 après l'infection					
Cellules immunes					
10 ⁷	7	4,69 ± 2,83*	4,59 ± 3,14	4,45 ± 2,68	4,27 ± 3,11
5 x 10 ⁷	9	4,27 ± 3,15 ^a	4,08 ± 1,97 ^a	2,21 ± 1,61 ^b	1,33 ± 1,10 ^b
10 ⁸	5	3,81 ± 2,73 ^a	3,41 ± 2,12 ^a	1,45 ± 0,97 ^b	0,59 ± 0,41 ^b
Cellules normales					
5 x 10 ⁷	6	4,72 ± 2,64	4,68 ± 2,38	4,67 ± 2,91	4,64 ± 2,85

* : Moyenne ± intervalle de confiance; les valeurs affectées d'un exposant différent sur une même ligne sont significativement différentes (risque $P \leq 0,05$).

le nombre de cellules transférées et le temps de stimulation *in vitro*.

Quelque 10⁷ cellules d'animaux immuns sont incapables d'induire une réduction du nombre d'oocystes puisque leur nombre dans les caeca au jour 7 après l'infection ne diffère pas, même après 20 h de stimulation *in vitro*, du nombre d'oocystes retrouvés chez les poulets ayant reçu des cellules d'animaux normaux.

Lorsque le nombre de cellules transférées est de 5 x 10⁷, le nombre d'oocystes au jour 7 post-infection est voisin de celui obtenu après le transfert du même nombre de cellules provenant de poulets normaux pour des durées d'incubation inférieures ou égales à 4 h. Il n'en est plus de même après 12 ou 20 h de stimulation *in vitro* puisque les nombres d'oocystes chutent de façon importante chez les receveurs de cellules d'animaux immuns, alors qu'ils restent constants chez les receveurs de cellules d'animaux normaux (différences significatives $P \leq 0,05$). Ces chiffres

correspondent à des protections de 48 à 69% après 12 et 20 h de stimulation.

Une même diminution est reproduite lorsque 10⁸ cellules sont transférées. Les pourcentages de protection atteignent alors 62% (12 h) et 85% (20 h). Pour la suite des expérimentations, 5 x 10⁷ cellules stimulées pendant 20 h ont été utilisées par animal receveur.

Tableau II. Protection (%) obtenue après transfert de cellules de poulets immuns stimulées *in vitro*.

Nature et nombre de cellules	Durée de stimulation <i>in vitro</i> (h)		
	4	12	20
Immunes			
10 ⁷	2	5	20
5 x 10 ⁷	4	48	69
10 ⁸	11	62	85
Normales			
5 x 10 ⁷	1	1	2

Protection croisée entre *E tenella* et *E acervulina* (tableau III)

Le transfert de 5×10^7 cellules provenant de poulets immuns contre *E tenella* stimulées par des antigènes de la même espèce de coccidie ou des antigènes d'*E acervulina* entraîne une réduction similaire du nombre d'oocystes émis par les receveurs après l'infection par *E tenella* par rapport à celui qui est émis par des poulets infectés pour la première fois. Cela correspond à des protections de 70 et 66%. Par contre, ce même transfert est sans effet sur une infection par *E acervulina* (protections respectives de 5 et 20%).

Les cellules provenant d'animaux immuns contre *E acervulina* sont par contre capables de transférer une protection contre une infection par *E acervulina*, mais aussi contre une infection par *E tenella*. Avec ces cellules, l'antigène homologue se révèle meilleur stimulant que l'antigène hétérologue. En effet, les résultats montrent que contre l'infection par *E tenella*, on obtient 68% de protection lorsque l'Ag total d'*E acervulina* est utilisé *in vitro*, mais seu-

lement 28% de protection lorsque l'Ag total d'*E tenella* est utilisé pendant la stimulation. Ces 2 chiffres deviennent respectivement 78 et 51% pour la protection obtenue à la suite d'une infection par *E acervulina*.

Pouvoir stimulant des antigènes de surface communs purifiés

Les antigènes de surface de sporozoïtes d'*E tenella* purifiés par immunoadsorption sur des anticorps anti-*E acervulina* ont un pouvoir stimulant se rapprochant de celui du sporozoïte en ce qui concerne les cellules provenant de poulets immuns contre *E acervulina* transférées à des receveurs subissant une infection par *E tenella* (69% de protection) ou par *E acervulina* (89% de protection). Ils ont aussi conservé la capacité de stimuler les cellules provenant de poulets immuns contre *E tenella* pour transférer la protection à des receveurs infectés par *E tenella* (72% de protection) mais ne permettent pas d'améliorer la protection que confèrent les cellules provenant de poulets immuns contre *E tenella*

Tableau III. Protection croisée entre *E tenella* et *E acervulina* à la suite d'un transfert de cellules de poulets immuns (5×10^7) restimulées *in vitro* (20 h) par des antigènes totaux d'*E tenella* et d'*E acervulina*.

Antigène utilisé pour la stimulation <i>in vitro</i>	Infection des receveurs	
	<i>E tenella</i> Nombre d'oocystes $\times 10^6$ et (% protection)	<i>E acervulina</i> Nombre d'oocystes $\times 10^6$ et (% protection)
Cellules immunes anti- <i>E tenella</i>		
<i>E tenella</i>	1,63 \pm 1,13 * (70)	5,20 \pm 3,11 (5)
<i>E acervulina</i>	1,89 \pm 1,07 (66)	5,38 \pm 2,59 (2)
Cellules immunes anti- <i>E acervulina</i>		
<i>E tenella</i>	3,48 \pm 1,40 (28)	2,84 \pm 1,45 (51)
<i>E acervulina</i>	1,77 \pm 0,88 (68)	1,31 \pm 1,02 (78)

* : Moyenne \pm intervalle de confiance; $n = 6$; poulets neufs ($n = 9$) infectés par *E tenella* : 5,48 \pm 2,57 (oocystes $\times 10^6$); poulets neufs ($n = 8$) infectés par *E acervulina* : 5,81 \pm 2,48 (oocystes $\times 10^6$).

Tableau IV. Protection obtenue après transfert de cellules de rates immunes (5×10^7), stimulées *in vitro* (20 h) par des antigènes de surface de sporozoïtes d'*E. tenella* purifiés sur colonne d'anticorps anti-*E. acervulina*.

Cellules immunes transférées	Infection des receveurs	
	E <i>tenella</i> Nombre d'oocystes $\times 10^6$ et (% protection)	E <i>acervulina</i> Nombre d'oocystes $\times 10^6$ et (% protection)
Anti- <i>E. tenella</i>	0,79 \pm 0,58 * (72)	4,21 \pm 2,74 (18)
Anti- <i>E. acervulina</i>	1,35 \pm 0,83 (69)	0,57 \pm 0,21 (89)

* : Moyenne \pm intervalle de confiance, $n = 8$; poulets neufs ($n = 8$) infectés par *E. tenella* : (4,31 \pm 2,09) oocystes $\times 10^6$; poulets neufs ($n = 8$) infectés par *E. acervulina* : (5,12 \pm 2,53) oocystes $\times 10^6$.

après infection des receveurs par *E. acervulina* (protection de 18%).

DISCUSSION

Des cellules lymphoïdes (rate ou ganglions mésentériques) d'animaux immuns (Oiseaux ou Mammifères) sont capables de conférer à des animaux neufs une protection contre leur coccidiose après transfert (revue dans Rose, 1987). Ces transferts ont permis de démontrer que l'immunité protectrice anticoccidienne avait une base cellulaire. Le travail présenté dans cet article est en accord avec ces résultats. Cependant, il apporte 3 données nouvelles.

Comme dans le cas du modèle parasitaire *Nippostrongylus brasiliensis* chez la souris (Rhalem *et al.*, 1988), une stimulation *in vitro* des cellules immunes par des antigènes solubles spécifiques permet de diminuer le nombre de cellules nécessaires pour en obtenir un résultat positif. Ainsi le nombre d'oocystes d'*E. tenella* présents dans les caeca au jour 7 après l'infection d'épreuve baisse de (3,81 \pm 2,73) \times

10^6 chez des receveurs de 10^8 cellules d'animaux immuns non stimulées à (0,59 \pm 0,41) $\times 10^6$ lorsque les cellules ont été stimulées *in vitro* pendant 20 h à l'aide des antigènes solubles d'oocystes sporulés du parasite (protection de 85%). Le nombre de cellules transférées doit cependant être supérieur ou égal à 10^7 et une stimulation de 12 h est nécessaire. Ce temps de stimulation est ici plus long que celui qui était requis pour le transfert d'une protection contre le nématode intestinal *Nippostrongylus brasiliensis* (4 h). Des cellules d'animaux non immuns stimulées ou non ne confèrent pas la protection, ce qui prouve la spécificité de la réaction.

Le transfert a donc été réalisé avec succès pour 2 coccidioses de la poule : la coccidiose caecale à *E. tenella* et la coccidiose intestinale à *E. acervulina*.

Les cellules de rate de plusieurs poules immunes ont été mélangées lors de la mise en culture et réinjectées à des poulets neufs sans qu'il soit tenu compte des antigènes d'histocompatibilité dans une souche de poules non histocompatibles. Le succès du transfert tient sans doute au fait que l'infection d'épreuve a été réalisée

dans les heures qui suivent ce transfert. On peut dès lors imaginer qu'un certain nombre de cellules immunes sont attirées localement (peut-être par l'inflammation) et y délivrent leurs effecteurs en inhibant le développement du parasite, les animaux étant sacrifiés avant que des réactions à l'encontre des cellules lymphoïdes ne portant pas les mêmes antigènes d'histocompatibilité n'apparaissent.

Alors que l'immunité anticoccidienne obtenue à la suite d'une infection est spécifique d'espèce (Rose, 1987) et que des phénomènes de diminution de l'immunité dirigée contre une espèce donnée par infection ultérieure des poulets à l'aide d'une autre espèce ont été notés (Yvoré *et al*, 1986), nous montrons ici que des cellules immunes stimulées spécifiquement *in vitro* peuvent induire une protection contre une infection pratiquée avec une autre espèce de coccidie. Les résultats obtenus ne sont pas symétriques : des cellules de poulets immuns contre *E tenella* stimulées *in vitro* confèrent une protection de 70% contre une infection ultérieure par le même parasite, mais ne confèrent aucune protection contre une infection par *E acervulina*. Au contraire, les cellules de poulets immuns contre *E acervulina* stimulées spécifiquement *in vitro*, transfèrent une protection importante non seulement contre une infection ultérieure homologue (78%), mais aussi contre une infection ultérieure par *E tenella* (68%). Une stimulation *in vitro* de ces cellules par des antigènes totaux d'*E tenella* leur confère le pouvoir de transférer une protection qui reste bonne contre *E acervulina* (51%) mais devient médiocre contre *E tenella* (28%).

Lillehoj (1987) avait montré que ces cellules de poulets immuns contre *E tenella* étaient stimulées *in vitro* par l'antigène homologue mais ne répondaient que faiblement contre des antigènes d'*E acervulina*.

Par contre, Prowse (1991) a démontré que des cellules de poulets immuns contre *E tenella* synthétisaient de l'interféron gamma à la suite d'une stimulation *in vitro* par des antigènes d'*E tenella* alors que les cellules de poulets immuns contre *E acervulina* réagissaient aussi bien avec des antigènes d'*E acervulina* qu'avec des antigènes d'*E tenella*. Ces résultats se rapprochent de ceux qui ont été obtenus ici en démontrant l'absence de symétrie du transfert.

La purification à l'aide des anticorps recueillis dans la bile d'animaux immuns contre *E acervulina* d'antigènes de surface des sporozoïtes d'*E tenella* communs aux 2 parasites (13 protéines, Rhalem *et al*, 1993), si elle permet de réaffirmer l'efficacité du transfert, ne change pas son caractère dissymétrique. Les cellules immunes contre *E tenella* protègent contre une infection homologue (72%) mais ne protègent que très partiellement contre une infection par *E acervulina* (18%). Au contraire, si la protection homologue obtenue par transfert des cellules immunes contre *E acervulina* stimulées *in vitro* par les antigènes de surface purifiés des sporozoïtes d'*E tenella* est totale lorsque l'infection ultérieure est effectuée avec *E acervulina* (89%), elle est importante lorsque cette infection est pratiquée avec *E tenella* (69%).

Une telle rupture de la spécificité d'espèce a été mise en évidence lors d'essais de vaccination de poulets par des antigènes recombinants, l'antigène recombinant GX3262 provenant d'*E tenella* induisant une protection contre *E tenella* mais aussi contre *E acervulina* (Bhogal *et al*, 1989). La spécificité d'espèce de coccidies (Rose, 1987) n'est donc pas absolue.

Le transfert de cellules d'animaux immuns à des animaux neufs peut être exploité dans l'avenir dans deux directions principales : compréhension des méca-

nismes de la protection contre les deux coccidioses (séparation de cellules, traitement par des anticorps monoclonaux anti-cellules ou anticytokines, comparaison avec des transferts de cellules hôtes compatibles) et sélection d'antigènes potentiellement vaccinnants d'autre part.

REMERCIEMENTS

Nous remercions M P Yvore (INRA, Pathologie aviaire et parasitaire, Nouzilly) qui nous a fourni des souches de coccidies et M C Carrat (INRA, Virologie et immunologie moléculaires) pour l'analyse statistique. Ce travail a bénéficié de l'aide matérielle de la Fondation Internationale pour la Science dans le cadre du Projet B/1747-1.

RÉFÉRENCES

- Boghjal BS, Miller GA, Anderson AC, Jesse EJ, Strausberg R, McCandliss R, Strausberg S (1989) Vaccination of chickens with recombinant *Eimeria tenella* antigen alone or in combination with a subclinical exposure induces cross-reactive protective immunity against coccidiosis. *Recent Adv Av Immunol Res* 131-146
- Bontemps M, Yvoré P (1974) Technique de purification des suspensions de sporozoites d'*Eimeria* sur colonne de fibres synthétiques. *Ann Rech Vét* 5, 109-113
- Bradford M (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254
- Danforth HD (1983) Use of monoclonal antibodies directed against *Eimeria tenella* sporozoites to determine stage specificity and *in vitro* effect on parasite penetration and development. *Am J Vet Res* 44, 1722-1727
- Davies PJ, Porter P (1979) A mechanism for secretory IgA-mediated inhibition of the cell penetration and intra-cellular development of *E tenella*. *Immunology* 36, 471-477
- Henderson LE, Oroszlan S, Konigsberg W (1979) A micromethod for complete removal of dodecyl sulfate from proteins by ion-pair extraction. *Anal Biochem* 93, 153-157
- Lillehoj HS (1987) Effect of immunosuppression on avian coccidiosis: cyclosporin A but not hormonal bursectomy abrogates host protective immunity. *Infect Immun* 55, 1616-1621
- Lillehoj HS, Kang SY, Keller L, Sevoian M (1989) *Eimeria tenella* and *E acervulina* lymphokines secreted by an avian T cell lymphoma or by sporozoite-stimulated immune T lymphocytes protect chickens against avian coccidiosis. *Exp Parasitol* 69, 54-64
- Murray PK, Boghjal BS, Crane MSJ, MacDonald TT (1986) *Eimeria tenella* *in vivo* immunization studies with sporozoites antigen. In: *Research in avian coccidiosis* (LR McDouglas, LP Joyner, PL Long eds). University of Georgia, Athens, 564-573
- Prowse S (1991) Cell mediated immunity to *Eimeria tenella* in the fowl: the absence of cross-species protection is not due to the lack of cross-reactive T cells. *Int J Parasitol* 21, 133-135
- Rhalem A, Bourdieu C, Luffau G, Péry P (1988) Partial purification of protective antigens from *Nippostrongylus brasiliensis* in mice. *Ann Inst Pasteur/Immunol* 139, 167-175
- Rhalem A, Bekhti K, Bourdieu C, Luffau G, Péry P (1989a) Vaccination de la souris contre la coccidiose murine par ingestion de protéines de surface d'*Eimeria falciformis* incorporées dans des liposomes. *CR Acad Sci Paris* 309, série III, 19-23
- Rhalem A, Bourdieu C, Luffau G, Péry P (1989b) Transfert adoptif de l'immunité contre *Nippostrongylus brasiliensis* chez la souris. Effet d'une restimulation *in vitro* des cellules immunes avant leur transfert. *CR Acad Sci Paris*, 309, série III, 53-57
- Rhalem A, Sahibi H, Dakkak A, Laurent F, Kazanji M, Yvoré P, Péry P (1993) Protective oral immunisation of chickens against *Eimeria tenella* with sporozoite surface antigens. *Vet Immunol Immunopathol* (sous presse)
- Reid WM (1975) Progress in the control of coccidiosis with anticoccidials and planned immunisation. *Am J Vet Res* 36, 593-599
- Rose ME, Mockett APA (1983) Antibodies to coccidia: detection by enzyme-linked immu-

- no-sorbent assay (ELISA). *Parasite Immunol* 5, 479-489
- Rose ME (1987) *Eimeria*, *Isospora* and *Cryptosporidium*. In: *Immunology, immuno-pathology and immunoprophylaxis of parasitic infection*, EJ Soulsby ed, CRC Press, Inc, Boca-Raton, FL, 275-312
- Trees AJ, Karim MJ, McKellar SB, Carter SD (1989) *Eimeria tenella*: local antibodies and interactions with the sporozoite surface. *J Protozool* 36, 326-333
- Yvoré P, Esnault A, Naciri M (1986) Effect of *Eimeria maxima* infection on development of *Eimeria tenella* in immunized chickens. *Ann Rech Vét* 17, 451-456