

INTERACTIONS CRYPTOSPORIDIES - VIRUS DE LA MALADIE DE MAREK CHEZ LE POULET

Hayet Abbassi, Françoise Coudert et Muriel Naciri

INRA, Station de Pathologie Aviaire et de Parasitologie, 37380 Nouzilly

Résumé:

Quarante deux poulets EOPS B13/B13 ont été divisés en 4 lots pour comparer l'effet de l'association du virus de la maladie de Marek (HPRS 16) administré à la naissance (J(-4)) et de *Cryptosporidium baileyi* inoculé par voie orale 4 jours plus tard (J0) (Lot A), à des lots témoins ayant reçu le virus seul (B), des *C. baileyi* seuls (C), et à un lot témoin sain (D). Les animaux du lot A ont présenté un état général très altéré, avec des symptômes respiratoires graves qui ont conduit à la mort de tous les sujets entre J8 et J39. 81,8% de ces poulets sont morts avant l'installation des premières lésions de la maladie de Marek. La mortalité dans le lot B (27,3%) n'a commencé qu'à J55 alors qu'aucune mortalité n'a été notée dans les lots C et D. L'excrétion parasitaire du lot A a été très élevée et plus durable de J4 jusqu'à la mort des animaux (J39), par rapport à celle du lot C (J4 à J21). Une infestation massive de la trachée, des poumons et souvent des reins par *C. baileyi* a été notée (lot A) à côté de celle des Bourses de Fabricius (BF) et du cloaque (Lots A et C). L'infection des poulets par le virus de la maladie de Marek semble induire l'expression d'un pouvoir pathogène exacerbé des *C. baileyi*, considérées comme agents non pathogènes après administration par voie orale.

Introduction

Les cryptosporidies, protozoaires du genre *Cryptosporidium*, comportent au moins deux espèces chez les volailles : *C. meleagridis* responsable de diarrhées chez la dinde (Tyzzer, 1929, Slavin, 1955) et *C. baileyi* décrite plus tard, colonisant la bourse de Fabricius (BF) et l'appareil respiratoire (Current *et al.* 1986). La maladie de Marek, due à un herpesvirus qui induit une prolifération tumorale des cellules lymphoïdes de type T dans un grand nombre d'organes et de tissus, se manifeste par des troubles généraux et la mort avec souvent des paralysies (Cauchy et Coudert, 1986). Un effet immunodépresseur est associé à l'infection par ce virus (Schat, 1996). Les cryptosporidies ont été décrites associées à des infections virales dans des élevages de volailles à problèmes, comme la réovirose (Ritter *et al.* 1986), la bursite infectieuse (Fletcher, 1976, Randall, 1982), la maladie de Marek (Fletcher, 1976, Naciri et Mazzella, 1988), et l'anémie infectieuse (Dobos-Kovacs *et al.*, 1994). L'effet synergique des ces co-infections virus-cryptosporidies a été confirmé expérimentalement pour la réovirose chez les colins avec *Cryptosporidium sp* (Guy *et al.* 1987), et chez le poulet avec *C. baileyi* (Guy *et al.* 1988). L'effet synergique de l'association entre *C. baileyi* et le virus de la bursite infectieuse a été controversé (Levy *et al.* 1988, Blagburn *et al.* 1991). Naciri *et al.* (1989) ont démontré un effet synergique du virus de la maladie de Marek (HPRS 16) et *Cryptosporidium sp* à tropisme intestinal. Notre objectif est d'étudier l'effet du virus HPRS 16 associé à *C. baileyi* à tropisme différent de *Cryptosporidium sp*.

Matériel et méthodes

1- Animaux et matériels

Quarante deux poulets EOPS de race Leghorn blanche, souche histocompatible d'haplotype B13/B13 ont été

utilisés pour leur grande sensibilité à la maladie de Marek. Dès la naissance, les poulets ont été divisés en 4 lots installés séparément dans des isolateurs ventilés en surpression dans une salle protégée en dépression. Les poulets bagués à l'aile à 8 jours, sont restés en isolateurs jusqu'à la fin de l'expérimentation (62 jours : J58). Ils ont été nourris *ad libitum* avec un aliment granulé non supplémenté et abreuvés à volonté. J0 étant le jour d'inoculation des cryptosporidies, la répartition des lots a été la suivante :

Lot A (11 poulets) : Infectés par le virus de la maladie de Marek (inoculation à J(-4)), et par des oocystes de *C. baileyi* (inoculation à J0)

Lot B (11 poulets) : Témoins maladie de Marek (inoculation à J(-4))

Lot C (10 poulets) : Témoins cryptosporidiose (inoculation à J0)

Lot D (10 poulets) : Témoins sains (non inoculés)

2- Inoculum

Virus : La souche HPRS16 du virus de la maladie de Marek régulièrement passée *in vivo* sur poulets B13/B13 a été administrée par voie intrapéritonéale à raison de 0,1 ml par poulet. Il s'agit de sang d'animaux malades conservé à - 180°C.

Cryptosporidies : Ces cryptosporidies proviennent à l'origine d'un élevage de canards de Barbarie. Les oocystes ont été isolés des bourses de Fabricius (BF) et la souche a été entretenue par des passages sur poulets ou cannetons EOPS tous les deux ou trois mois. Les oocystes de *C. baileyi* ont été conservés à +4°C dans du bichromate de potassium à 2%. Au moment de l'utilisation, le bichromate a été éliminé et le nombre d'oocystes a été ajusté à $2,5 \times 10^6$ par ml, après numération à l'aide des cellules de Thoma. Chaque poulet a reçu 0,2 ml, soit 5×10^5 oocystes par voie orale.

3- Critères étudiés

Excrétion d'oocystes de *C. baileyi* : Des prélèvements individuels des fientes ont été réalisés au moins trois fois par semaine. Les oocystes de *C. baileyi* ont été mis en évidence et numérotés par une méthode semi quantitative, utilisant le saccharose de densité 1,27. Les excréments ont été notés selon un score de 0 à 5 établi en fonction du nombre d'oocystes par champ microscopique (x250). L'équivalent de chaque score en nombre d'oocystes par gramme de fientes a été déterminé lors d'un essai préliminaire (1 : $< 10^5$, 2 : de 10^5 à 10^6 , 3 : de 10^6 à 5×10^6 , 4 : de 5×10^6 à 10^7 , 5 : $> 10^7$ oocystes par gramme de fientes).

Suivi clinique : Des observations quotidiennes des symptômes cliniques ont été réalisées et les morts ont été identifiés et autopsiés. Les lésions macroscopiques dues aux cryptosporidies et/ou à la maladie de Marek ont été enregistrées. Des prélèvements de certains organes (nerfs sciatiques, trachée, poumons, reins, et BF) ont été effectués pour une étude histologique afin de compléter le diagnostic de la maladie de Marek et de mettre en évidence la présence éventuelle des cryptosporidies sur les coupes histologiques. La localisation des *C. baileyi* a aussi été étudiée à l'état frais par raclage de la muqueuse intestinale (duodénum, jéjunum, iléum, caecum et cloaque), de la BF, de la trachée, et sur des frottis des poumons, foie, reins, et sacs aériens. A la fin de l'expérimentation, les animaux restant en vie ont été sacrifiés et autopsiés.

Résultats

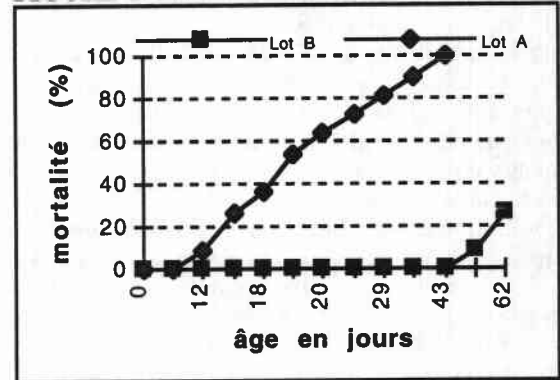
Lot A : Une atteinte de l'état général avec un retard de croissance très marqué ont été notés à partir de J6. Les poulets étaient faibles, anorexiques, prostrés, plumes ébouriffées et souvent immobiles. Des symptômes respiratoires graves : toux, éternuements, bruits respiratoires et halètements, ont conduit à la mort tous les poulets entre J8 et J39 (Figure 1). L'excrétion parasitaire était très élevée et durable de 10^6 à 10^7 oocystes par gramme de fientes de J8 jusqu'à la mort de tous les poulets (Figure 2). 81,8% des poulets sont morts avant l'apparition des premières lésions de la maladie de Marek. Les résultats des autopsies (lésions macroscopiques et histologiques) et ceux de la localisation de *C. baileyi* à l'état frais sont résumés dans les Tableaux 1 et 2

Lot B : Les premiers symptômes visibles de la maladie de Marek sont apparus autour de J36 sous forme d'anémie (pâleur des crêtes). La mortalité a débuté à J55 et n'a été que de 27,3% à la fin de l'expérimentation (J58)(Figure 1). Tous les poulets de ce lot, morts naturellement ou sacrifiés, ont développé des lésions spécifiques de la maladie de Marek caractérisées par des hypertrophies des nerfs sciatiques, du foie et/ou de la rate et parfois du coeur, et des tumeurs des nerfs, des gonades, du coeur, du foie et/ou retroorbitales. Dans ce lot, les animaux n'ont jamais excrété de cryptosporidies, la morbidité vis-à-vis de la maladie de Marek a été de 100%.

Lot C : Une légère diarrhée et un faible retard de croissance transitoires ont été notés chez certains sujets. L'excrétion d'oocystes a duré 18 jours de J4 à J21 et lors de l'autopsie à J58, aucun oocyste de *C. baileyi* n'était présent sur tous les organes explorés à l'état frais. Aucune mortalité n'a été notée dans ce lot.

Lot D : Les 10 poulets n'ont jamais excrété de cryptosporidies, ni présenté de symptômes de la maladie de Marek.

FIGURE 1: Mortalité cumulée des lots A et B



Discussion

Les résultats de notre étude, de l'association du virus de la maladie de Marek inoculé à des poulets B13/B13 à la naissance et de *Cryptosporidium baileyi* inoculé 4 jours plus tard (J0) (Lot A) révèlent un effet synergique de l'association des 2 agents pathogènes. *C. baileyi* inoculé seul, par voie orale, aux poulets (Lot C) n'entraîne pas de symptômes graves. Comme l'ont indiqué d'autres auteurs (Lindsay et Blagburn, 1990) le parasite se localise exclusivement dans le cloaque et la BF et l'infection passe le plus souvent inaperçue sauf si l'on examine les fientes. Le développement asymptomatique de *C. baileyi* chez les poulets du Lot C s'accompagne d'une excrétion d'oocystes pendant 18 jours de J4 à J21 avec un pic d'excrétion à J10 alors que dans le Lot A l'excrétion commence aussi à J4 mais persiste à un score élevé de 3 à 4,5 correspondant à 10^6 - 10^7 oocystes par gramme de fientes jusqu'à la mort des animaux. Quelle que soit la voie d'inoculation, les oocystes de *C. baileyi* sont excrétés pendant une période plus ou moins longue mais limitée. La durée des périodes prépatente et patente varient en fonction de l'âge du poulet et de la dose d'inoculation (Lindsay et Blagburn, 1990, Rhee *et al.*, 1995). Dans notre étude, l'infection devient chronique et dure 39 jours au lieu de 18 jours montrant l'absence d'acquisition d'immunité vis-à-vis de *C. baileyi* par les poulets du Lot A. Dans les élevages de volailles où *C. baileyi* a été observé associé à des problèmes respiratoires parfois graves et même à de la mortalité, d'autres agents pathogènes sont souvent mis en évidence. L'affinité de *C. baileyi* pour les cellules épithéliales du tractus respiratoire a été expérimentalement démontrée après inoculation par voies intra-trachéale ou intra-péritonéale (Current *et al.*, 1986, Lindsay et Blagburn, 1990). Or, dans

FIGURE 2 : Cinétique d'excrétion moyenne d'oocystes de *C. baileyi*. Méthode de flottation : 1 : < à 1, 2 : de 1 à 5, 3 : de 6 à 20, 4 : de 20 à 30, 5 : > à 30 oocystes par champ microscopique.

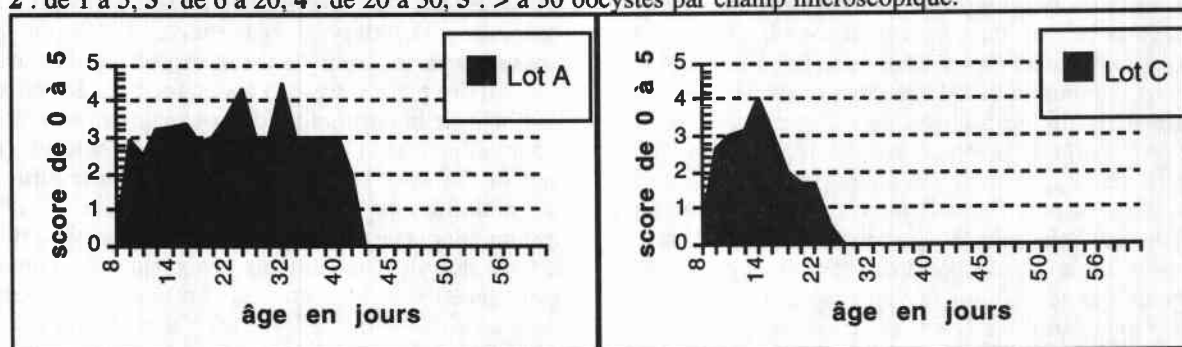


TABLEAU 1 : Lésions enregistrées chez les poulets du lot A.

* Etude histologique réalisée à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes par Y. CHEREL

Nbr de sujets morts	Lésions Macroscopiques	Lésions Histologiques *
de J8 à J15 : 6	Petite taille, cachexie, inflammation de la muqueuse buccale (aspect noirâtre), urates abondants dans les conduits urinaires.	Nerfs: RAS
de J16 à J20 : 2	Petite taille, cachexie, inflammation de la muqueuse buccale (aspect noirâtre), urates abondants dans les conduits urinaires, néphrite aiguë: reins à aspect encéphaloïde.	Nerfs: RAS BF: Picnose surtout corticale, phagocytose médullaire. Hyperplasie et vacuolisation épithéliale, cryptosporidies+++ Trachée: Hyperplasie épithéliale, cryptosporidies+++ Poumons: Congestion légère.
à J25 : 1	Petite taille, cachexie, inflammation de la muqueuse buccale (aspect noirâtre), néphrite, mucus abondant dans la trachée, pneumonie, transudat dans la région thoracique.	Nerfs: RAS BF: Inflammation sévère, atrophie, cryptosporidies+++ Reins: Nécrose urétérale et cryptosporidies+++. Néphrose multifocale. Petites infiltrations interstitielles. Présence de rares cryptosporidies dans de petits tubes acidophiles.
à J29 : 1	Petite taille, cachexie, inflammation de la muqueuse buccale (aspect noirâtre), sacs aériens opaques, reins décolorés, mucus abondant dans la trachée, oedème des poumons, pneumonie, transudat dans la région thoracique.	Nerfs: Infiltration lymphoïde sévère : Marek. BF: Hyperplasie épithéliale, cryptosporidies+++ Reins: Uretérite mononucléée sévère avec cryptosporidies dans l'épithélium. Cryptosporidies dans les tubes collecteurs sans réactions interstitielles marquées.
à J39 : 1	Petite taille, maigre, mucus abondant dans la trachée, oedème des poumons, transudat du côté thoracique, hypertrophie des nerfs sciatiques, tumeurs du coeur et de l'ovaire.	Nerfs: Infiltrations lymphoïdes . BF: Atrophie massive. Inflammation sévère. Cryptosporidies++ Trachée: Destruction de l'épithélium, zone d'atrophie. Poumons : Cryptosporidies, Mucopus (mucus + lésions inflammatoires), congestion sévère. Reins: Nécrose multifocale, picnose principalement localisée aux tubes centromédullaires, présence d'un foyer lymphoïde probablement tumoral.

TABLEAU 2 : Localisation des oocystes de *C. baileyi* (méthode de flottation). b : organes :

Lar : larynx, Tr: trachée, Pm: poumon, SA: sacs aériens, Cae: caecum, Clq: cloaque, - : non étudié, 0 : absence, + : peu, ++ quantité intermédiaire,+++ : beaucoup d'oocystes

a/b	Lar	Tr	Pm	BF	rein	SA	Cae	Clq
J8	-	+++	+	+++	-	-	++	-
J11	-	+++	+++	+++	-	-	++	-
		+	+	+++			+	
J14	-	+	+++	+++	+	-	++	-
J15	-	+++	++	++	+	-	++	-
		+++	+		+		++	
J16	-	+++	++	+++		-	++	-
J20	++	+++	+++	++	0	-	++	-
J25	+	+	+	+++	+++	+	++	++
J29	++	++	+	+++	++	+++	++	++
J39	+++	+++	+	+++	+++	0	++	0

notre étude, après inoculation par voie orale, tous les poulets du Lot A ont présenté des symptômes respiratoires graves. Ces symptômes sont apparus très tôt (J6) et ont conduit à une mort précoce, de J8 à J39, tous les poulets tandis qu'aucun symptôme et aucune mortalité n'étaient observés chez les poulets du Lot C.

Les poulets du Lot A ne parviennent pas à éliminer le parasite, au contraire, ce dernier infeste d'autres organes et se multiplie plus intensément. Lindsay et Blagburn, (1990) ont montré que ce parasite se développe rarement (<10%) dans la trachée et les bronches après une inoculation par voie orale. L'état

immunitaire des poulets pourrait être la cause principale du développement massif et continu de *C. baileyi* car le virus de la maladie de Marek induit deux phases d'immunodépression successives qui concernent surtout l'immunité cellulaire (Schat, 1996). De plus, des poulets thymectomisés, inoculés par voie orale avec *C. baileyi*, révèlent une excrétion deux fois supérieure en quantité et en durée par comparaison à des témoins non thymectomisés, montrant le rôle majeur de l'immunité à médiation cellulaire dans le contrôle de la cryptosporidiose (Sréter *et al.* 1996). Cette immunodépression due au virus de la maladie de Marek pourrait donc favoriser le développement des cryptosporidies. Ce développement intense et durable, en l'absence de réinfection, pourrait s'expliquer par le recyclage des mérozoïtes de type I et l'excystation des oocystes sporulés à paroi mince *in situ* (Current *et al.* 1986). Naciri *et al.* (1989) ont obtenu des résultats similaires avec *Cryptosporidium* sp. à tropisme intestinal, associé également au virus de la maladie de Marek. Chez les poulets du Lot A, l'infestation massive et précoce du tractus respiratoire et l'invasion du tractus urinaire à J.14 (non recherchée avant J14) par *C. baileyi* laisse suggérer que les poulets ne se sont pas infectés tardivement par inhalation mais que la barrière immunitaire locale a été franchie. Notre hypothèse est différente de celle de Lindsay et Blagburn (1990) qui suggèrent que la localisation dans la trachée peut être liée à l'inspiration ou l'inhalation d'oocystes excrétés dans les fientes et dissipés dans l'air : dans leur étude, et contrairement à la nôtre, l'infestation de la trachée n'apparaît que tardivement (17 et 19 jours PI). La localisation urinaire est très rare, elle a été constatée chez un fringillidé (Gardiner et Imes 1984), chez un oiseau en captivité (*Gallus sonneratii*) (Randall 1986) et une seule fois chez des poules pondeuses (Nakamura et Abe 1988) mais n'a jamais pu être reproduite expérimentalement (Lindsay et Blagburn, 1990). La sévérité de la maladie respiratoire augmente considérablement quand les cryptosporidies sont associées à des pathogènes respiratoires comme le virus de la bronchite infectieuse ou les *E. coli* (Blagburn *et al.* 1991). Dans notre essai, des poulets SPF ont été utilisés et maintenus en isolateurs, dans des conditions bien contrôlées, empêchant toute contamination par d'autres agents pathogènes, en particulier, ceux du tractus respiratoire. Nos résultats confirment que l'infection par *C. baileyi*, inoculé par voie orale, peut s'étendre à d'autres organes que le cloaque et la BF, quand elle est précédée d'une infection par le virus HPRS 16. Lors de notre étude, nous constatons 100% de mortalité dont 81,8% sont survenus avant le développement des premières lésions de la maladie de Marek et sont probablement dus à la cryptosporidiose respiratoire. Un tel taux de mortalité n'a jamais été observé dans les conditions naturelles. Ceci pourrait s'expliquer par une charge virale moins importante dans les élevages, ou par le fait que les poulets sont souvent vaccinés contre plusieurs maladies virales. Ces problèmes peuvent survenir dans le cas d'un échec ou d'une rupture de vaccination dus à une mauvaise vaccination (Naciri et Mazzella 1988) ou à une infection par des souches très virulentes capables de franchir l'immunité vaccinale. Il est à noter que dans

les élevages, lors de l'infestation de la trachée par ce parasite, des pertes ciliaires totales peuvent être observées (Lindsay et Blagburn, 1990) ce qui prédisposerait à une invasion secondaire du tractus respiratoire par d'autres agents comme les *E. coli* qui profitent de la destruction de la barrière mucociliaire pour exprimer une certaine pathogénicité. En conclusion, sous l'effet d'une infection par le virus de la maladie de Marek, connu par son effet immunodépresseur, *C. baileyi* inoculé par voie orale infeste des sites inhabituels et exprime un pouvoir pathogène exacerbé. Cette étude montre l'importance de mieux connaître ces parasites, dont l'effet propre reste discuté.

Références

- Blagburn B.L., Lindsay D.S., Hoerr F.J., Davis J.F., Giambrone J.J., 1991. J. Parasitol. 38, 25S-27-28S.
 Cauchy L., Coudert F., 1986. Rev. Sci. Tech. Off. int. Epiz., 5, 1011-1024.
 Current W.L., Upton S.V., Haynes T.B., 1986. J. Parasitol., 33, 289-296.
 Dobos-Kovacs M., Varga I., Békési L., Drén CsN., Németh I., Farkas T., 1994. Avian Pathol., 23, 365-368.
 Fletcher O.J., Munnell J.F., Page R.K., 1975. Avian Dis., 19, 630-639.
 Gardiner, C.H., Imes, G.D., 1984. J. Am. Vet Med. Assoc., 185, 1401-1402.
 Guy J.S., Levy M.G., Ley D.H., Barnes H.J., Gerig T.M., 1987. Avian Dis., 713-722.
 Guy J.S., Levy M.G., Ley D.H., Barnes H.J., Gerig T.M., 1988. Avian Dis., 32, 881-890.
 Levy M.G., Ley D.H., Barnes H.J., Gerig T.M., Corbett W.T., 1988. Avian Dis., 32, 803-811.
 Lindsay D.S., Blagburn B.L., 1990. In: Cryptosporidiosis in man and animals. Dubey J.P., Speer C.A., Fayer R. (eds) CRC, Press, pp199.
 Naciri M., Mazzella O., 1988. Rec. Méd. Vét., 164, 311-312.
 Naciri M., Mazzella O., Coudert F., 1989. Rec. Méd. Vét., 165, 383-387.
 Nakamura K., Abe F., 1988. Avian Pathol., 17, 703-711.
 Randall C.J., 1982. Avian Pathol., 11, 95-102.
 Randall C.J., 1986. Vet. Rec., 119-130.
 Rhee J.K., Jang B.G., Park B.K., 1995. Korean J Parasitol., 3, 45-54.
 Ritter G.D., Ley D.H., Guy J.S., Barnes H.J., 1986. Avian Dis., 30, 603-608.
 Schat K.A., 1996. In : Poultry Immunology. Davison T.F., Morris T.R., Payne L.N. (eds). Abingdon (GBR) : CarFax Publishing Copamy®, pp463. (Poultry Science Symposium Series vol. 24)
 Slavin D., 1955. J. Comp. Pathol., 65, 262-266.
 Sréter T., Varga I., Békési L., 1996. Parasitol. Res., 82, 174-177.
 Tyzzer E.E., 1929. Am. J. Hyg., 10, 269-383.

Vifs remerciements aux équipes des Maladies à Protozoaires et de Virologie et Oncologie Aviaires de l'INRA de Nouzilly.