

**SPORULATION DES OOCYSTES D'*EIMERIA* : L'APTITUDE À SPORULER
D'*E. ACERVULINA* ET *E. MELEAGRIMITIS* DÉPEND DU DÉLAI
QUI SUIT LA FORMATION DES OOCYSTES**

**Reperant Jean-Michel¹, Thomas-Henaff Martine¹, Benoit Chantal¹, Le Bihannic Pierre¹,
Athimon Stéphane², Chevalier Denis³, Eddarai Ghislaine⁴, Lefort Claire⁵, Leorat Jean⁶,
Le Quillec Yannick⁷, Mahamat Ahmat Arafat⁸, Midy Grégoire⁹, Papin Elodie¹⁰,
Rocaboy Gaëtan¹¹, Le Pottier Gilles¹²**

¹Anses, Unité VIPAC, Laboratoire de Ploufragan Plouzané, BP 53, 22440 PLOUFRAGAN

²Sanders Bretagne, Le Pont de St Caradec, 56910 SAINT GÉRARD

³Mq2Mix, Zone de la Basse Haye, 35220 CHÂTEAUBOURG

⁴Univet, Impasse Monge, 22600 LOUDÉAC

⁵Triskalia, ZA de Kermelin Ouest, 18 rue Ampère, BP 60040, 56890 SAINT AVÉ CEDEX

⁶Selvet Conseil, ZA du Bronut, 56500 MORÉAC

⁷CECAB, Saint Léonard Nord, 56450 THEIX

⁸Techna, Route de St Etienne de Montluc, BP 10, 44220 COUERON

⁹Terrena, La Noëlle, BP 20199, 44155 ANCENIS

¹⁰Coopérative le Gouëssant, 1 rue de la Jeannaie, BP 40228, 22402 LAMBALLE

¹¹Deltavit (groupe CCPA), ZA du Bois de Telay, Quartier du Haut Bois, 35150 JANZÉ

¹²CIDEF / CIPC, BP 24, 35310 MORDELLES

Jean-Michel.REPERANT@anses.fr

RÉSUMÉ

Les oocystes de coccidies des volailles ont quelquefois du mal à sporuler, alors que les conditions optimales connues semblent réunies. Nous avons étudié la capacité des oocystes d'*Eimeria acervulina* (parasite du poulet) et d'*Eimeria meleagrimitis* (parasite de la dinde) à sporuler en fonction de leur maturité, après prélèvement à différents moments directement dans l'intestin. Les oocystes très jeunes sporulent très mal et leur capacité à sporuler augmente avec le temps. Ces observations ont été faites avec deux isolats de coccidies de poulet et un isolat de coccidie de dinde. La sporulation des oocystes collectés dans les matières fécales est bien meilleure que dans le tube digestif, suggérant que des phénomènes de maturation semblent survenir dans le tube digestif. Parmi les hypothèses possibles, nous envisageons d'étudier plus en détail l'étape de fécondation qui pourrait se produire au niveau de l'oocyste au lieu du macrogamète, cette dernière cible étant couramment admise mais non démontrée.

ABSTRACT

Sporulation of *Eimeria* oocysts: ability of *E. acervulina* and *E. meleagrimitis* to sporulate depends on time after the formation of oocysts

The oocysts of coccidia from poultry sometimes hardly sporulate, while known optimal conditions seem to be fulfilled. We studied the ability of the oocysts of *E. acervulina* (a parasite of chicken) and *E. meleagrimitis* (a parasite of turkey) to sporulate depending of their maturity, after collection at different periods directly in the intestine. Very young oocysts hardly sporulate and their ability to sporulate increases with time. These observations were done with two isolates of chicken coccidia and one isolate of turkey coccidia. Sporulation of oocysts collected in the droppings is much better than in the gut, suggesting occurrence of maturation phenomena in the digestive tract. Among the possible hypotheses, we plan to study in details the stage of fertilization that could happen at the oocyst level instead of the macrogamete, this latter target being commonly accepted although not demonstrated.

INTRODUCTION

Les coccidies sont des protozoaires parasites obligatoires appartenant au phylum des *Apicomplexa*. La plupart des espèces sont strictement inféodées à leurs hôtes respectifs. Ces parasites sont très fréquents en aviculture et ils constituent la première cause de pertes économiques dans les élevages de galliformes. Le cycle de développement de ces parasites est monoxène et se déroule principalement dans l'intestin et/ou les caeca. Il comprend une étape de multiplication du nombre d'éléments parasitaires appelée schizogonie, suivie d'une phase de reproduction sexuée appelée gamogonie, qui conduit à la production de nombreuses formes de résistance et de dissémination, les oocystes. Ces oocystes, émis dans les matières fécales, contiennent une seule cellule et ne sont pas directement infectieux à ce stade. Ils nécessitent une étape de maturation, comportant des divisions cellulaires et différenciation des cellules infectieuses, appelée sporogonie ou sporulation. La sporulation des oocystes est considérée depuis longtemps comme dépendante exclusivement de facteurs environnementaux comme la disponibilité en oxygène, la température et l'hygrométrie. Cependant, même dans des conditions optimales, les oocystes ne sont parfois pas capables de sporuler et les taux de sporulation sont très faibles.

Dans notre laboratoire, il a été observé qu'*Eimeria meleagridis*, coccidie spécifique des dindons, a un pourcentage de sporulation très faible lorsqu'elle est collectée dans le duodénum et le jéjunum, ses sites de développement, alors que le taux de sporulation est meilleur dans les matières fécales, même s'il reste faible en comparaison avec d'autres espèces de coccidies.

Des travaux publiés rapportent une diminution de l'aptitude à sporuler lors de supplémentation avec le diclazuril (anticoccidien de synthèse), alors que la maduramicine (anticoccidien ionophore issu de fermentation) n'affecte pas cette capacité à sporuler (Löwenstein & Kutzer, 1989). D'autres études ont montré que l'amprolium et le dinitolmide (deux anticoccidiens de synthèse) diminuaient la sporulation en fonction de la sensibilité des coccidies à ces deux molécules (Mathis et McDougald, 1981) et que l'amprolium et l'arprinocid réduisaient la sporulation chez plusieurs espèces de coccidies (Ruff *et al.*, 1978, 1993). Des retours de vétérinaires sur le terrain (communication personnelle) rapportent une mauvaise sporulation des oocystes après un traitement avec l'amprolium.

Parmi les hypothèses pouvant expliquer ces phénomènes de variation de la capacité à sporuler, nous avons voulu étudier l'influence du degré de maturité des oocystes, au niveau de leur site de développement dans la muqueuse de l'intestin. Nous

avons choisi *Eimeria acervulina* qui parasite le duodénum du poulet et *Eimeria meleagridis* qui se développe dans le duodénum du dindon. Ces deux espèces localisées dans le premier tiers de l'intestin grêle sont susceptibles de subir un phénomène de maturation avant leur excrétion avec les matières fécales, qui peut durer plus longtemps que chez des espèces à localisation plus distale.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Coccidies

Des prélèvements de fientes ont été réalisés dans des élevages sur le terrain de façon hebdomadaire entre deux et sept semaines d'âge, période la plus propice pour retrouver des coccidies dans les élevages. Un dénombrement sur cellule de MacMaster a permis d'évaluer la cinétique de production des coccidies, et les prélèvements les plus riches ont été conservés. Les coccidies de ces isolats ont été inoculées une première fois à des oiseaux pour obtenir une génération d'oocystes frais. Ces oocystes ont été séparés des matières fécales avec des méthodes classiques de flottation en solution saturée en chlorure de sodium et de cycles de centrifugation, puis mis à sporuler pendant trois jours à 28°C en milieu semi solide sur gélose Agar-Agar. Une seconde infection avec récupération des oocystes dans le duodénum au bout de 103 heures environ a permis d'éliminer les autres espèces de coccidies susceptibles d'être présentes dans les isolats initiaux, afin de ne conserver qu'*E. acervulina* pour le poulet et *E. meleagridis* pour la dinde. Deux isolats d'*Eimeria acervulina* et un isolat d'*E. meleagridis* ont été utilisés dans les études présentées.

1.2. Animaux et infections expérimentales

Des coquelets (souche Isabrown) et des dindonneaux (souche Hybrid Grade Maker) conventionnels issus de couvoirs commerciaux ont été mis en place à un jour d'âge dans des animaleries exemptes de coccidies, avec accès *ad libitum* à l'eau et l'aliment. Ils ont été transférés dans une animalerie protégée à l'âge de 22 jours et ont été infectés deux jours plus tard par voie orale avec une suspension de 10.000 oocystes sporulés à l'aide d'une sonde oesophagienne sous un volume de 1 mL.

1.3. Prélèvements et observations

Autour de la fin de la période prépatente de chaque espèce de coccidie (97 heures pour *E. acervulina* et 103 heures pour *E. meleagridis*), un oiseau a été euthanasié toutes les heures, et l'intestin grêle a été rapidement prélevé. La présence ou l'absence d'oocystes dans le duodénum et le haut du jéjunum a été évaluée par raclage de muqueuse et observation microscopique. Le cas échéant, les oocystes ont été

collectés, toujours par raclages de muqueuse. Une solution de bichromate de potassium à 2% a été ajoutée au produit de raclage, afin de neutraliser d'éventuels phénomènes de maturation susceptibles de se produire après avoir récupéré les oocystes. Les suspensions ont été incubées à 28°C, et après 48 ou 72 heures et 10 ou 11 jours, le pourcentage d'oocystes sporulés a été évalué par observation au microscope. Le degré de sporulation d'oocystes collectés dans les matières fécales a également été mesuré dans certaines des études.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

Deux études ont été réalisées avec *E. meleagridis*. Dans la première, les prélèvements réalisés de 98 à 101 heures étaient trop précoces et n'ont pas permis de mettre en évidence d'oocystes. Dans la seconde étude, les prélèvements ont été effectués de 118 à 126 heures post-infection (figure 1-a). Le pourcentage de sporulation, faible autour de 5% jusqu'à 121 heures, était plus élevé de 122 à 126 heures, de l'ordre de 20%. Dans les matières fécales, ce pourcentage était supérieur à 70%.

Chez le poulet, nous avons utilisé deux isolats d'*E. acervulina*. Avec le premier isolat, des prélèvements effectués de 72 à 80 heures n'ont pas permis d'observer des oocystes dans les raclages. Ces prélèvements étaient probablement trop précoces, mais la durée de la période prépatente minimale d'*E. acervulina* n'est pas consensuelle (97 heures généralement admis, mais 89 heures seulement selon Shirley, 1995 pour la souche Houghton). Une seconde étude avec des prélèvements duodénaux entre 87 et 96 heures ont permis de récupérer des oocystes dès 87 heures, mais ces oocystes ont très mal sporulé (2% de sporulation après 3 jours). Les pourcentages de sporulation des oocystes collectés les heures suivantes étaient progressivement plus élevés, pour atteindre 60% à 96 heures. Dans les matières fécales, 88% des oocystes ont sporulé.

Avec le second isolat d'*E. acervulina*, une première étude avec prélèvements de 87 à 95 heures n'a pas permis de mettre en évidence d'oocystes. Nous avons donc effectué deux autres études avec des prélèvements de 112 heures à 119 ou 120 heures post-infection. Des oocystes ont pu être collectés à toutes les heures de prélèvement et traités de la même façon que les oocystes d'*E. meleagridis* comme décrit précédemment. Même si les pourcentages de sporulation ne sont pas les mêmes aux différents temps dans les deux études, l'augmentation progressive de cette capacité à sporuler est bien dépendante du temps (figure 1-b). Une dernière étude a été faite avec cet isolat avec des prélèvements entre 95 et 103 heures, afin de voir ce qui se passe sur ces créneaux horaires. Étonnamment, les pourcentages de sporulations ont été plus élevés dans cet essai, mais la

croissance progressive était toujours présente. Néanmoins, les résultats obtenus dans les différentes études suggèrent que cette évolution dans la capacité à sporuler est bien dépendante du temps, mais pas de façon fixe à partir de l'instant de l'infection. Ceci peut remettre en question la notion de période prépatente minimale définie pour les différentes espèces de coccidies.

Des différences de pourcentage de sporulation assez importantes ont parfois été observées après 3 jours de délai de sporulation et 11 jours avec les mêmes échantillons. En théorie, nous aurions dû obtenir un peu plus d'oocystes sporulés à 11 jours, mais le résultat était parfois inverse et nous n'avons pas trouvé d'explication à cette observation. Toutefois, les évolutions à 3 et 11 jours étaient globalement similaires.

Cette évolution de la capacité à sporuler indique qu'un phénomène se passe au niveau de l'oocyste, indépendant des critères environnementaux qui influencent la sporulation dans le milieu extérieur. Plusieurs hypothèses pourraient expliquer cette observation :

1. Il pourrait s'agir d'un phénomène de maturation biologique ou chimique de l'oocyste, qui va s'opérer pendant son transit dans le tube digestif. Il est possible que la paroi de l'oocyste (ou le « voile » entourant l'oocyste) ait une certaine perméabilité lorsqu'il est néoformé, et que cette perméabilité transitoire permette l'achèvement chimique du développement de cet oocyste. Un moyen de tester cette hypothèse serait de prélever des oocystes en transit dans différentes portions de l'intestin et de mesurer leur capacité à sporuler. Nous avons tenté d'effectuer des prélèvements à la jonction jéuno-iléale et à la jonction iléo-caecale, mais nous n'avons pas pu isoler d'oocystes dans les raclages effectués. Nous envisageons de refaire ces essais en augmentant les doses infectieuses pour avoir des chances de capturer des oocystes en transit à ces endroits.

2. La fécondation pourrait se produire au stade oocyste au lieu du stade macrogamète, ce qui est couramment admis. En effet, le macrogamète puis l'oocyste se développent à l'intérieur d'une cellule de l'hôte, plus ou moins enfouie dans la muqueuse selon l'espèce de coccidie. Il est difficile de comprendre comment le microgamète (l'élément mâle flagellé fécondant) parvient à franchir ces barrières pour féconder l'élément femelle. Il semblerait beaucoup plus facile pour le microgamète de féconder l'oocyste après sa libération dans la lumière du tube digestif. Ferguson, dans une communication en 2005, indiquait qu'il n'avait jamais pu observer de microgamète à proximité de macrogamètes d'*Eimeria*, alors qu'il avait réussi à observer des microgamètes collés sur la paroi des oocystes, parfois entre le « voile » et la couche externe de l'oocyste. Des travaux de Long (1972) visant à réduire la quantité de microgamètes

avaient entraîné de faibles niveaux de sporulation des oocystes. La fécondation se produisant au stade de l'oocyste expliquerait l'effet observé de certains anticoccidiens qui pourraient « tuer » ou inhiber les microgamètes, conduisant à l'excrétion d'oocystes stériles incapables de sporuler. Nous sommes également en train d'explorer cette piste qui peut conduire au développement de nouvelles voies de contrôle de l'infection coccidienne et de ses effets délétères.

CONCLUSION

Globalement, nous avons constaté que la capacité de sporulation augmentait avec l'âge des oocystes, les meilleurs résultats ayant été obtenus avec les oocystes récupérés dans les matières fécales. Les très jeunes oocystes collectés au niveau de leur site de développement ont un potentiel de sporulation très

faible, qui évolue au fil des heures, pour les espèces *Eimeria acervulina* du poulet et *Eimeria meleagridis* de la dinde. Ces résultats suggèrent qu'un phénomène semble se produire dans l'intestin et permettre une meilleure sporulation. Parmi les hypothèses pouvant expliquer ce phénomène, nous étudions actuellement les mécanismes de fécondation pour savoir si l'oocyste ne peut pas être fécondé par le microgamète, ce qui pourrait expliquer cette capacité croissante à sporuler avec l'âge des oocystes.

Ce travail bénéficie d'une labellisation par le pôle de compétitivité Valorial, avec soutien financier du Conseil Général des Côtes d'Armor, de Saint-Brieuc Agglomération, des Régions Bretagne et Pays de la Loire.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Christensen J.F., 1939. J. Agric. Res., (59) 527-534
2. Ferguson D.J.P., 2005. Proceedings of the IXth International Coccidiosis Conference, Foz do Iguassu, 41-50
3. Long P.L., 1972. Zeitschrift für Parasitenkunde, (39) 27-37
4. Löwenstein M. and Kutzer E., 1989. Wien. Tierärztl. Mschr., (76) 368-370
5. Mathis G.F. & Mc Dougald L.R., 1981. Parasitology, (83) 281-284
6. Ruff M.D., Anderson W.I. and Reid M.W., 1978. J. Parasitol., (54) 306-311
7. Ruff M.D., Garcia R., Chute M.B. et al., 1993. Avian Dis., (37) 988-992
8. Shirley M.W., 1995. In : COST 89/820. (Ed.), Biotechnology: Guidelines on techniques in coccidiosis research. European Commission, Luxembourg. 1-24

Figure 1. Evolution du pourcentage de sporulation au cours du temps des oocystes collectés au niveau duodénal : a- d'*Eimeria meleagridis* 118 à 126 heures après infection (les droites sur le graphique indiquent le pourcentage de sporulation des oocystes collectés dans les matières fécales) et b- d'*Eimeria acervulina* 112 à 119,5 heures après infection. En vert : valeurs après 3 jours de délai de sporulation, en rouge : valeurs après 11 jours de délai

