

ISOLEMENT D'UN VIRUS HERPÈS DANS UN ÉLEVAGE DE PIGEONS DE CHAIR (1)

H. VINDEVOGEL, P. P. PASTORET, G. BURTONBOY,
M. GOUFFAUX et J. P. DUCHATEL
avec la collaboration technique de Nicole DELFERRIÈRE et Martine GODARD

*Faculté de Médecine vétérinaire de l'Université de Liège,
Service de Pathologie aviaire (Professeurs A. GRANVILLE et L. FIÉVEZ),
45, rue des Vétérinaires,
1070 Bruxelles*

*Université catholique de Louvain,
Laboratoire de Virologie,
4, avenue Chapelle aux Champs,
1 200 Bruxelles*

SUMMARY

HERPES VIRUS ISOLATED FROM PIGEONS

A virus has been isolated from pigeons with the clinical symptoms of « infectious coryza ». The virus produces numerous pocks on the chorio-allantoic membranes ; livers from infected embryos have areas of necrosis. Microscopic examinations reveals basophilic and eosinophilic intranuclear inclusions.

The virus produces a cytopathic effect of rounded refractile cells after 24 h which rapidly spreads throughout the monolayer. The virus is sensitive to chloroform.

Electron microscopy of negatively stained lysed cell preparations shows that the virus is a herpesvirus.

The strain is pathogenic for pigeons. Lesions produced by intralaryngeal inoculation consists of small necrotic foci in the laryngeal epithelium and in the liver.

Key-words : *herpes, pigeon, virus.*

INTRODUCTION

En 1945, SMADEL *et al.*, rapportent la présence aux U.S.A. d'une maladie chez le Pigeon, d'étiologie probablement virale, caractérisée par la présence d'inclusions intranucléaires éosinophiles au niveau du foie, de la rate et du pancréas.

(1) Recherches subventionnées par l'Institut pour l'Encouragement de la Recherche scientifique dans l'Industrie et l'Agriculture (I.R.S.I.A.).

MARTHEDAL et JYLLING (1966) isolent au Danemark un virus à partir de pigeons présentant de l'œsophagite.

CORNWELL, *et al.* (1967) décrivent en Angleterre une infection chez le Pigeon par un virus herpétique.

Depuis lors, d'autres virus de type herpès ont été isolés de pigeons par KRUPICKA *et al.* (1970) en Tchécoslovaquie et par BOYLE (1973) en Australie.

Un virus de même type a été isolé en Belgique. Le présent travail décrit l'isolement, la caractérisation et le pouvoir pathogène de cette souche virale.

TECHNIQUES EXPÉRIMENTALES ET MATÉRIEL UTILISÉ

1. — *Isolement du virus*

La maladie est apparue dans un petit élevage de pigeons de chair, provoquant une mortalité élevée chez les jeunes.

Le virus a été isolé d'un sujet de 5 semaines qui présentait de la rhinite, de la conjonctivite et de la dyspnée.

A l'autopsie, nous avons observé des lésions diphtéroïdes sur la muqueuse buccale et laryngée, de l'aérosacculite et des foyers de nécrose hépatique.

Le larynx, la trachée et les poumons de ce pigeon ont été, après broyage, dilués à 10 p. 100 dans du bouillon tryptose additionné d'antibiotiques (pénicilline 10 000 U et streptomycine 10 mg par ml) ; après clarification (3 000 g pendant 10 minutes) 0,2 ml du surnageant a été inoculé sur la membrane chorio-allantoïdienne d'œufs embryonnés âgés de 10 jours.

Six passages en série du virus ont été réalisés suivant la même technique et selon le principe des dilutions limites.

La présence d'inclusions a été recherchée dans les membranes chorio-allantoïdiennes infectées et les foies des embryons. Les tissus sont fixés au Bouin et les coupes à la paraffine colorées à l'hématoxyline éosine ou par la réaction nucléale de Feulgen.

La dose infectieuse (DIO) 50 p. 100 est calculée, suivant la méthode De Reed et Muench, en comptant le nombre d'embryons dont les membranes chorio-allantoïdiennes présentent des lésions caractéristiques.

2. — *Cultures primaires de fibroblastes d'embryons de poulet*

Les cultures sont obtenues à partir d'embryons de poulet âgés de 10 jours par 2 cycles successifs de trypsination de 30 minutes à 37°C.

Les cellules embryonnaires sont ensemencées à raison de 750 000 cellules par ml de milieu.

Le milieu de croissance utilisé est du MEM (minimum essential medium) à concentration normale en acides aminés non essentiels avec la solution saline de Earle et 2 g par litre de NaHCO₃. Il est additionné de 3 p. 100 de sérum foetal de veau, de 10 p. 100 de bouillon tryptose phosphate, d'une solution d'antibiotiques et d'un mycostatique (pénicilline 100 000 U streptomycine 50 mg et natamycine 0,2 mg pour 100 ml).

Les boîtes de Petri Falcon (60 mm de diamètre) et les bouteilles de Roux Falcon (75 cm²) sont ensemencées respectivement au moyen de 5 et 75 ml de suspension cellulaire.

Après 24 heures de culture, le milieu est éliminé et les cellules inoculées. On laisse le virus s'adsorber pendant 1 heure à 37°C. Les cultures sont ensuite recouvertes avec du milieu d'entretien dont la teneur en sérum foetal de veau est réduite à 1 p. 100.

Les cultures sont incubées à 37°C et celles en boîtes de Petri sont maintenues sous un mélange de 95 p. 100 d'air sec et de 5 p. 100 de CO₂.

L'effet cytopathogène est étudié après coloration de la couche cellulaire au Wright-Giemsa (Diff Quick).

3. — *Préparation des stocks de virus*

La souche virale est multipliée sur fibroblastes d'embryons de poulet.

Pour ce faire, une suspension dans du MEM de membranes chorio-allantoïdiennes au 6^e passage est centrifugée ; 20 ml du surnageant contenant 10⁶ UFP (unités formant plaque)

sont inoculés sur une couche monocellulaire de fibroblastes d'embryons de poulet en bouteille de Roux.

Après 72 heures, les cellules altérées par le virus sont mises en suspension dans le milieu d'entretien par agitation mécanique.

Cette suspension est titrée au moment de son prélèvement et après congélation avec ou sans 5 p. 100 de diméthylsulfoxyde (DMSO). Les particules virales sont recherchées au microscope électronique en coloration négative.

4. — Titrage de l'infectivité du virus

Le titrage s'effectue sur fibroblastes d'embryons de poulet en boîtes de Petri sous carboxyméthylcellulose (CMC) ou sous agarose. Chaque boîte est inoculée avec 0,2 ml des dilutions virales de progression géométrique de raison 1/10^e.

Titrage sous CMC.

Le milieu est additionné de 0,6 p. 100 de CMC. Après 4 jours, la couche monocellulaire est rincée 3 fois puis fixée au formol à 10 p. 100 et colorée à la carbolfuschine. Les plages sont comptées.

Titrage sous agarose.

Le milieu est additionné de 0,8 p. 100 d'agarose. Après 4 jours, les cellules sont fixées au formol à 10 p. 100 pendant 24 heures et colorées au May-Grünwald Giemsa après enlèvement de la gélose. Les plages sont dénombrées au microscope inversé (grossissement 20 fois).

5. — Sensibilité au chloroforme

Un volume de chloroforme est ajouté à un volume du stock de virus. Ce mélange est maintenu 1 heure à 4°C sous agitation lente. Le chloroforme est éliminé par centrifugation (1 000 g pendant 10 mn).

Le titre du virus traité est comparé au titre du même virus non traité.

6. — Microscopie électronique

Pour l'examen au microscope électronique, les suspensions de virus ont été préparées suivant la méthode de pseudoréplique telle qu'elle est décrite par Smith (1967).

Le contraste de la coloration négative est obtenu grâce à une solution de 2 p. 100 d'acide phosphotungstique amenée à pH 7 par addition de quelques gouttes d'hydroxyde de potassium Normal. Les grilles ont été examinées dans un microscope Philips EM 300 sous une tension de 80 KV.

Le grossissement du microscope était calibré au moyen d'une réplique de réseau linéaire (échantillon d'étalonnage Balzers Union). Les dimensions des particules ont été mesurées sur les épreuves photographiques au moyen d'un micromètre Zeiss.

7. — Évaluation du pouvoir pathogène

Dix pigeons de onze semaines sont inoculés par voie intralaryngée au moyen de 10⁵ UFP. Cinq, sept et neuf jours après l'inoculation, trois pigeons sont sacrifiés. Les prélèvements tissulaires sont fixés au Bouin et les coupes à la paraffine colorées à l'hématoxyline éosine.

RÉSULTATS

1. — Cultures sur membranes chorio-allantoïdiennes

Le premier passage de la suspension tissulaire sur œufs embryonnés a provoqué la mort des embryons 4 à 5 jours après l'inoculation.

Les membranes chorio-allantoïdiennes sont parsemées de pustules blanchâtres

(« pocks ») de taille variable. Les plus petites, inférieures à 1 mm, confluent pour former des foyers blanchâtres de 2 à 3 mm de diamètre entourés de grosses lésions ovalaires et linéaires. Les foies des embryons sont parsemés de foyers nécrotiques. De nombreuses inclusions intranucléaires éosinophiles et basophiles sont observées dans les pustules des membranes chorio-allantoïdiennes et en périphérie des foyers nécrotiques dans les foies des embryons. Les inclusions éosinophiles sont de type Cowdry ; les inclusions basophiles sont positives à la réaction nucléale de Feulgen. Le surnageant d'une suspension de membranes chorio-allantoïdiennes au 6^e passage sur œufs embryonnés titre $10^{6,17}$ DIO 50 p. 100 et $5 \cdot 10^5$ UFP par ml.

2. — Cultures sur fibroblastes d'embryons de poulet

L'effet cytopathogène observé sur fibroblastes d'embryons de poulet se caractérise par l'apparition de foyers de cellules rondes et réfringentes dont certaines ont un diamètre 2 à 3 fois supérieur à la normale.

Lorsque la culture est inoculée au moyen d'une suspension cellulaire non congelée et non diluée de fibroblastes d'embryons de poulet infectés par le virus, l'effet cytopathogène envahit toute la couche cellulaire après 24 heures.

Avec un inoculum décongelé et dilué, les foyers apparaissent après 48 heures et augmentent progressivement pour atteindre 1 à 3 mm après 4 jours.

Sur préparations colorées, les noyaux au centre des zones manifestant un effet cytopathogène sont pycnotiques. Des vacuoles apparaissent dans le cytoplasme et refoulent les noyaux. Certaines cellules possèdent un noyau bilobé et beaucoup sont bi, tri ou quadrinuclées. Quelques grosses cellules rondes ont 5 à 7 noyaux disposés en périphérie.

3. — Titrage de l'infectivité du virus

Les méthodes de titrage sous CMC ou sous agarose donnent des résultats identiques.

Le stock virus titre $1 \cdot 10^6$ UFP par ml au moment de son prélèvement. Après 15 jours de congélation à -20°C ou dans l'azote liquide, le titre tombe à $5 \cdot 10^4$ UFP par ml. Par contre, l'addition de DMSO permet de conserver $3,5 \cdot 10^6$ UFP par ml.

4. — Action du chloroforme

Après traitement du stock virus au chloroforme, on ne détecte plus aucune UFP sur culture de fibroblastes d'embryons de poulet.

5. — Microscopie électronique

L'aspect des particules virales permet de les classer dans le groupe herpès.

Ce sont des virus enveloppés. Lorsque le colorant pénètre la membrane, il met en évidence les détails de la nucléocapside dont les sous unités semblent arrangées en un icosaèdre régulier.

On peut calculer le nombre total de capsomères suivant la formule de HORNE et WILDY (1961) :

$$10(N - 1)^2 + 2 = 162$$

N étant le nombre de capsomères formant une arête de l'icosaèdre : 5.

Le diamètre moyen d'une nucléocapside est de 100 nm. Les virions présentent donc l'aspect et les dimensions caractéristiques du groupe herpès tels qu'ils sont décrits par ROIZMAN et SPEAR (1973).

6. — *Pouvoir pathogène*

Cinq jours après l'inoculation, les pigeons ont présenté de la conjonctivite et une congestion intense des muqueuses buccales et laryngées, couvertes par endroits d'un exsudat mucopurulent.

De petits foyers nécrotiques blanchâtres ont été observés sur les muqueuses buccales et laryngées ainsi que sur le voile du palais de 6 pigeons.

L'examen histopathologique a révélé la présence de foyers de nécrose au sein des épithéliums digestifs et respiratoires de la bouche et du larynx, de même que dans les glandes salivaires.

Quelques cellules situées en bordure de ces foyers nécrotiques et de nombreuses cellules parenchymateuses hépatiques renferment des inclusions intranucléaires éosinophiles et basophiles.

Aucune lésion n'a été décelée dans la rate, ni dans le pancréas. Le dixième pigeon mourut 2 semaines après l'inoculation. Les examens macroscopique et microscopique révélèrent de multiples foyers parenchymateux de nécrose hépatique.

DISCUSSION

Le coryza du Pigeon est une maladie contagieuse très répandue en Europe. L'étiologie de cette affection n'a pas encore été étudiée d'une manière approfondie.

Nous avons isolé une souche virale dans un élevage de pigeons de chair qui présentaient les symptômes cliniques de cette maladie.

Le virus provoque l'apparition de pustules sur les membranes chorio-allantoïdiennes d'œufs embryonnés. L'examen histopathologique révèle la présence de nombreuses inclusions intranucléaires.

Sur culture de fibroblastes d'embryons de poulet, le virus produit un effet cytopathogène qui envahit rapidement toute la couche cellulaire. Le virus est sensible aux solvants des graisses. Les virions présentent, au microscope électronique, l'aspect et les dimensions caractéristiques des virus du groupe herpès.

Le virus est pathogène pour le Pigeon. Il reproduit, après inoculation, les symptômes et les lésions de la maladie. Une enquête épidémiologique devrait nous permettre de préciser l'importance d'une étiologie herpétique dans le coryza infectieux du Pigeon.

Des virus de type herpès ont déjà été isolés à partir de pigeons malades (CORNWELL *et al.*, 1967 ; KRUPICKA *et al.*, 1970 ; BOYLE, 1973).

Ces souches possèdent les mêmes caractères de culture et sont peut-être identiques à celle isolée en Belgique. Il sera intéressant de comparer leurs caractères antigeniques.

Dans la maladie expérimentale, les lésions principales observées par CORNWELL *et al.* (1970) consistent en pancréatite et péritonite aiguë. Les pigeons inoculés avec notre souche ont essentiellement présenté des symptômes respiratoires et des lésions buccales, laryngées et hépatiques. Aucune lésion n'a été mise en évidence dans le pancréas, ni sur le péritoine. Toutefois, les chercheurs de Glasgow ont inoculé les pigeons par voie intrapéritonéale, alors que nous avons infecté nos animaux par voie intralaryngée.

Reçu pour publication en septembre 1975.

RÉSUMÉ

Un virus a été isolé à partir de pigeons présentant les symptômes cliniques du coryza et caractérisé comme un membre du groupe Herpès.

Ce virus est pathogène pour le Pigeon ; il reproduit les symptômes et les lésions de la maladie après inoculation intralaryngée.

Mots clés : *herpès, pigeon, virus.*

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BOYLE D. B., 1973. Isolation of a herpesvirus from a pigeon. *Australian Vet. J.*, **49**, 54.
- CORNWELL H. J. C., WEIR A. R., FOLLETT E.A.C., 1967. A herpesvirus infection of pigeons. *Vet. Rec.*, **81**, 267.
- CORNWELL H. J. C., WRIGHT N. G., 1970. Herpesvirus infection of pigeons. I. Pathology and virus isolation. *J. Comp. Path.*, **80**, 221-227.
- CORNWELL H. J. C., WRIGHT N. G., McCUSKER H. B., 1970. Herpesvirus infection of pigeons. II. Experimental infection of pigeons and chicks. *J. Comp. Path.*, **80**, 229-232.
- CORNWELL H. J. C., WEIR A. R., 1970. Herpesvirus infection of pigeons. III. Use of embryonated eggs for the growth and characterization of the virus. *J. Comp. Path.*, **80**, 509-515.
- CORNWELL H. J. C., WEIR A. R., 1970. Herpesvirus infection of pigeons. IV. Growth of the virus in tissue-culture and comparison of its cytopathogenicity with that of the viruses of laryngo-tracheitis and pigeon-pox. *J. Comp. Path.*, **80**, 517-523.
- HORNE R. N., WILDY P., 1961. Symetry in virus architecture. *Virology*, **15**, 348-373.
- MARTHEDAL H. E., JYLLING B., 1966. Oesophagitis in pigeons, presumably caused by a virus. *Nord. Vet. Med.*, **18**, 565-568.
- KRUPICKA V., SMID B., VALICEK L., PLEVA V., 1970. Isolement sur la membrane chorio-allantoïdienne d'œufs embryonnés d'un virus herpès du Pigeon (Tchèque). *Vet. Med. (Praha)*, **15**, 609-612.
- ROIZMAN B., SPEAR P., 1973. Herpes viruses, in *Ultrastructures of animal viruses and bacteriophages*, **5**, chap. 5. DALTON A. J., HAGUENEAU F., ed.
- SMADEL J. E., JACKSON E. B., HARMAN J. W., 1945. A new virus of pigeons. I. Recovery of the virus. *J. exp. Med.*, **81**, 385-398.
- SMITH K. O., 1967. Identification of viruses by electron microscopy. *Cancer Research*, **1**, chap. X. HARRIS BUSCH A. P., ed.

PLANCHE

PLANCHE I

FIG. 1

Inclusion intranucléaire dans un foie d'embryon de poulet 4 jours après l'inoculation (HE 200 fois).

FIG. 2

Effet cytopathogène sur une culture de fibroblastes d'embryons de poulet 3 jours après l'inoculation (contraste de phase 40 fois).

FIG. 3

Virions enveloppés et nucléocapside isolée (le trait noir correspond à 0,1 micron).

FIG. 4

Groupes de nucléocapsides : l'aspect vide est dû à la pénétration du colorant (le trait noir correspond à 0,1 micron).

FIG. 5

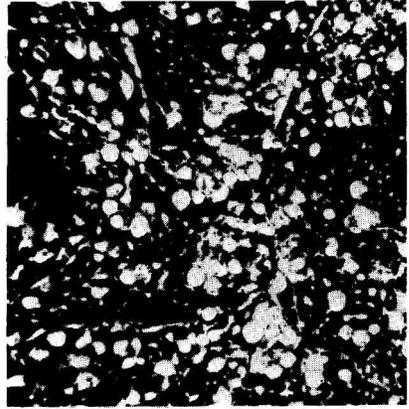
La pénétration du colorant montre les détails de la membrane et l'arrangement des capsomères (le trait noir correspond à 0,1 micron).

FIG. 6

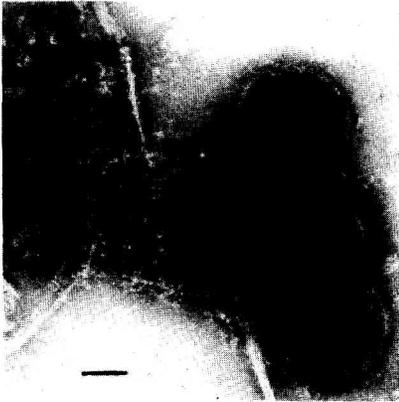
Inclusions intranucléaires dans le foie d'un Pigeon 5 jours après l'inoculation (HE 40 fois).



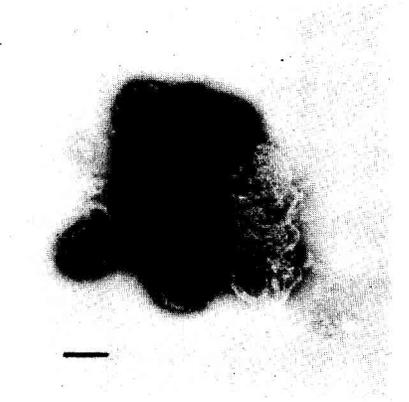
1



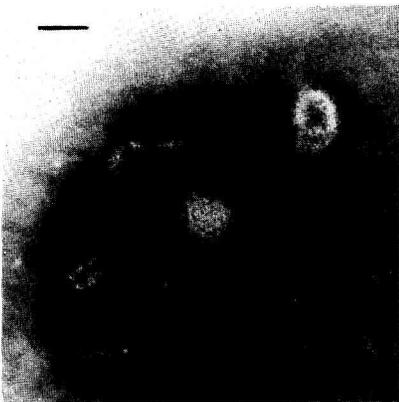
2



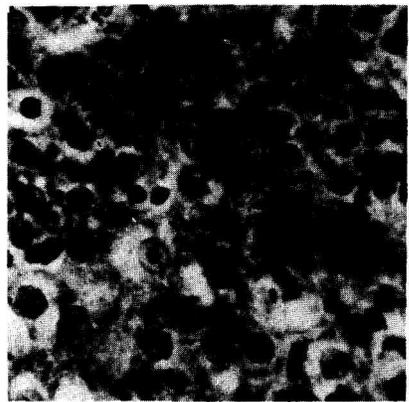
3



4



5



6