

LES COCCIDIOSES AVIAIRES : IMPORTANCE ET PERSPECTIVES DE RECHERCHE

AVIAN COCCIDIOSIS: IMPORTANCE AND RESEARCH PROSPECTS

Par Muriel NACIRI et Fabien BROSSIER⁽¹⁾
(communication présentée le 18 décembre 2008)

RÉSUMÉ

Les coccidioses aviaires sont des maladies ayant de graves conséquences économiques. Elles sont provoquées par des parasites à développement intracellulaire obligatoire appelés *Eimeria*. Les *Eimeria* sont monoxènes et se développent spécifiquement dans les entérocytes de l'épithélium intestinal, ce qui engendre des perturbations de l'homéostasie pouvant conduire à la mort de l'animal. La prophylaxie repose sur l'utilisation d'anticoccidiens et sur la vaccination. Le coût élevé des vaccins, et l'apparition de résistances aux anticoccidiens soulignent la nécessité de trouver des moyens de lutte alternatif. Un système de transgénèse chez les *Eimeria* a été mis au point, ce qui permet d'envisager, pour la première fois, l'étude fine des mécanismes moléculaires impliqués dans les processus infectieux. Cette avancée capitale en recherche fondamentale pourrait aboutir, à plus long terme, à la création de nouvelles formulations vaccinales. Dans cette communication, nous discuterons de l'utilisation potentielle d'inhibiteurs de protéases parasitaires comme anticoccidiens de nouvelle génération.

Mots-clés : *Eimeria*, prophylaxie, transgénèse, protéase.

SUMMARY

Avian coccidial infections are associated with a heavy economic burden. They are caused by obligate intracellular parasites of the genus *Eimeria*. These parasites are host specific and invade epithelial cells of animal intestines, causing severe damages that can lead to the host's death. Prophylaxis relies on the use of anticoccidial drugs and vaccination. However, the vaccines' high costs and the emergence of anticoccidial drug resistance highlight the need to develop alternative control methods. A transgenic population of *Eimeria* has been developed recently, and this new tool will help study, for the first time, the molecular mechanisms involved in *Eimeria* infectious processes. Besides, this main advance in basic research could lead, in the longer time, to the development of new vaccine preparations. In this communication, we will also discuss the use of parasitic protease inhibitors as new putative anticoccidial drugs.

Key words: *Eimeria*, prophylaxis, transgenesis, protease

(1) INRA – Centre de Tours, Infectiologie Animale et Santé Publique, 37380 Nouzilly.

Les *Eimeria* sont responsables de maladies animales graves appelées coccidioses. Ces parasites font partie de la famille des apicomplexes, un groupe d'agents pathogènes de haute importance économique, vétérinaire et médicale, comprenant entre autres *Toxoplasma gondii*, l'agent de la toxoplasmose et *Plasmodium falciparum*, un des agents du paludisme. Les parasites apicomplexes sont caractérisés par un complexe d'organelles apicales comportant des protéines essentielles aux différentes étapes d'invasion et de développement à l'intérieur de la cellule de l'hôte. Le cycle infectieux des *Eimeria* spp. a lieu uniquement dans les entérocytes (figure 1). Le cycle biologique se divise en une phase asexuée commençant avec l'ingestion d'oocystes sporulés et l'invasion des cellules épithéliales par la première forme infectante, le sporozoïte. Après de nombreux cycles de réplication dans les entérocytes, les *Eimeria*, qui se retrouvent sous une forme appelée mérozoïte, entrent dans la phase sexuée où les parasites se différencient en gamètes mâles et femelles. La fécondation des gamètes femelles par les gamètes mâles donne naissance à des oocystes non sporulés qui seront excrétés dans les fèces de l'animal. Au contact de l'air, l'oocyste sporule et abrite alors les sporozoïtes. Il n'existe pas, à ce jour, de lignée cellulaire capable de maintenir le cycle du parasite dans son entier *in vitro*. Seul le stade sporozoïte envahit des cellules en culture, s'y multiplie et engendre des mérozoïtes incapables d'envahir de nouvelles cellules. Le cycle est donc interrompu précocement *in vitro*.

Il a été décrit sept espèces d'*Eimeria* capables de parasiter différents segments de l'intestin de poulet. Chez le poulet de chair, cinq espèces sont fréquemment rencontrées : *E. acervulina* et *E.*

praecox dans le duodénum, *E. maxima* de part et d'autre du diverticule de Meckel, *E. mitis* dans l'iléon et *E. tenella* dans le caecum. Plus rare, *E. brunetti* deviendrait de plus en plus fréquente dans les élevages pratiquant la vaccination. La septième, *E. necatrix*, parasite des animaux plus âgés tels que les poulettes de remplacement ou les reproducteurs. De ces sept espèces d'*Eimeria*, *E. tenella* est la plus virulente. Son génome a été séquencé et est maintenant en cours d'annotation (www.genedb.org/genedb/etenella/, Ling et al. 2007).

LES COCCIDIOSES AVIAIRES ET LES MOYENS DE LUTTE

Les coccidioses représentent le premier fléau parasitaire de l'aviculture. Leur impact économique est mondial et est estimé à plus de deux milliards de dollars (Williams 1999). La réplication massive des *Eimeria* dans l'intestin de l'hôte provoque de nombreuses perturbations de l'homéostasie avec des lésions observables macroscopiquement, des pertes de poids, dans le cas d'une infection par *E. tenella*, des diarrhées sanglantes qui peuvent entraîner la mort. Les pertes de production observées sont dues à la mortalité mais surtout à la morbidité qui, plus insidieuse, se traduit par une malabsorption, une faible croissance et une mauvaise efficacité alimentaire chez le poulet de chair. Les infections par *Eimeria* entraînent également un défaut de qualité dans certaines productions comme celle du poulet jaune et une chute de ponte accompagnée d'une décoloration de la coquille et du jaune de l'œuf. Les pertes économiques nécessitent donc des moyens de lutte efficaces apportés depuis plus de 50 ans par les anti-coccidiens et les vaccins.

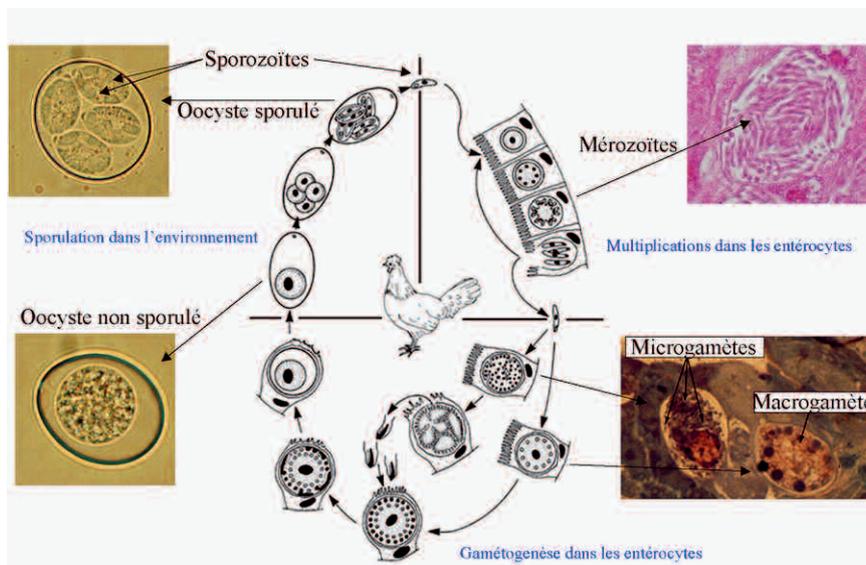


Figure 1 : Cycle biologique d'*Eimeria tenella*. Les sporozoïtes envahissent les entérocytes des caeca des poulets et s'y multiplient pour donner des mérozoïtes qui lysent les cellules infectées et envahissent les cellules voisines. Après trois cycles de multiplication, les mérozoïtes tertiaires se différencient en gamètes mâles (microgamètes) et gamètes femelles (macrogamètes). La fécondation des macrogamètes par les microgamètes donne naissance à un oocyste non sporulé, libéré dans le milieu extérieur. En présence de l'oxygène de l'air, l'oocyste sporule et contient alors 8 sporozoïtes. Les clichés des gamètes proviennent du site : <http://www.umanitoba.ca/faculties/science/zoology/faculty/dick/z346/eimerhome.html>.

Les anticoccidiens

Les anticoccidiens sont encore aujourd'hui la principale méthode de lutte. En élevage de poulets de chair, la méthode consiste à administrer aux animaux, pendant toute la durée de l'élevage (à l'exception de la période de retrait légale avant l'abattage) et dans l'aliment, une substance capable d'inhiber le développement du parasite ou de le détruire. Deux grandes classes sont sur le marché : les produits chimiques de synthèse qui agissent sur le métabolisme du parasite et les ionophores, dérivés de la fermentation microbienne, qui altèrent le transport d'ions à travers la membrane du parasite, perturbant la balance osmotique. Ces anticoccidiens ne sont pas des médicaments et sont soumis à la législation européenne sur les additifs (directive de 1970 du conseil de la CEE modifiée ensuite). Actuellement, onze produits sont autorisés pour le poulet de chair et parmi

ceux-ci, cinq sont autorisés chez la poulette, future pondeuse. Ils sont mis sur le marché lorsqu'ils répondent à plusieurs critères : être actifs vis-à-vis de toutes les espèces présentes chez l'hôte, ne pas être toxiques pour l'hôte, ne pas avoir d'incidences sur la qualité de la viande ou de la carcasse, être compatibles avec les autres composants de l'aliment, et ne pas nuire à la santé du consommateur. Une utilisation raisonnée de ces anticoccidiens permet, sur le terrain, de retarder l'apparition de résistances qui est la principale limite de leur utilisation. Les ionophores présentent l'avantage sur les produits de synthèse d'une perte d'efficacité progressive sans apparition brutale de la résistance, mais plusieurs inconvénients en limitent l'utilisation : leur dose efficace est proche de la dose toxique, ils sont incompatibles avec certains produits médicamenteux et ils sont un danger pour certaines espèces animales. L'apparition de résistances a stimulé la recherche d'autres méthodes préventives comme la vaccination.

Les vaccins

L'immunité protectrice induite par les infections naturelles par *Eimeria spp.* est si efficace que des vaccins vivants, basés sur l'administration de souches sauvages, sont utilisés depuis plus de 50 ans dans l'industrie aviaire partout dans le monde (Shirley et al. 2005). Ces formulations vaccinales comportent un faible nombre d'oocystes sporulés de plusieurs, voire de toutes les espèces d'*Eimeria* et ceci, afin de pallier l'absence de protection croisée entre espèces. Toutefois, malgré un fort pouvoir protecteur, la potentialité des souches sauvages à provoquer des coccidioses a souligné la nécessité de créer de nouvelles générations de vaccins efficaces et dénués de risque. Ces dernières années ont vu apparaître l'utilisation de souches de virulence atténuée, appelées souches précoces. Résultat de passages successifs, chez l'animal des premiers oocystes récupérés lors d'une infection, ces souches précoces sont caractérisées par la perte des dernières générations de la phase asexuée et donc par un cycle infectieux plus court (McDougald & Jeffers, 1976; Shirley & Bellati, 1984, 1988; Kawazoe et al. 2005). En comparaison avec les souches sauvages dont elles dérivent, les souches précoces ont un déficit de production d'oocystes et une virulence atténuée. En revanche, leur pouvoir immunoprotecteur reste très efficace. Ces souches ont été incorporées dans des préparations vaccinales de deuxième génération présentant moins de risque pour l'animal. En France, les vaccins Paracox-5 et 8 sont utilisés. La vaccination consiste en l'administration par voie orale d'un mélange de souches précoces aviaires. Malgré ces avancées majeures dans la stratégie vaccinale, les coûts de production de chaque souche précoce restent élevés, avec une durée de vie des vaccins limitée dans le temps. Dans le futur, il sera utile de développer des vaccins plus faciles à produire, si possible sans besoin d'avoir recours aux poulets et moins coûteux, comme des vaccins acellulaires comportant plusieurs antigènes protecteurs spécifiques des différentes espèces d'*Eimeria spp.* ou des vaccins à ADN. À ce jour, aucune autre alternative aux vaccins vivants n'a été obtenue : les antigènes protecteurs d'*Eimeria spp.* restent inconnus, même si les années 1990 ont été marquées par

la recherche d'antigènes potentiellement vaccinaux (Péry et al. 1995; Refega et al. 2003). Ces essais de vaccination n'ont apporté qu'une protection partielle contre une réinfection (Kazanji et al. 1994; Girard et al. 1999). Depuis le début des années 2000, la recherche contre la coccidiose aviaire se réoriente vers l'étude des interactions parasite-cellule hôte (Labbé et al. 2005; Periz et al. 2007).

LES DÉFIS DE LA TRANSGENÈSE

L'existence d'outils de génétique, développés depuis longtemps chez les protozoaires apicomplexes modèles tels que *T. gondii* et *P. falciparum*, a facilité la mise au point de souches vaccinales et la compréhension des mécanismes moléculaires et immunitaires impliqués dans l'interaction du parasite avec son hôte. Cependant, l'étude de ces deux parasites à eux seuls ne peut rendre compte de la diversité des mécanismes d'infection mise en jeu par d'autres parasites de la même famille, comme les *Eimeria*, distincte par leur cycle biologique, leur spectre d'hôtes ou encore le type de cellules cibles infectées. Récemment, une avancée capitale a été réalisée par deux équipes dans la stratégie d'obtention de souches recombinées chez *E. tenella*. Pour la première fois, une souche exprimant de façon stable la Yellow Fluorescent Protein (YFP) a été créée (Clark et al. 2008; Yan et al. 2008). Afin de s'affranchir de l'absence de modèles cellulaires permettant de cultiver le parasite *in vitro*, ces auteurs ont obtenu une population homogène de parasites exprimant la YFP par passages successifs *in vivo* chez le poulet (Clark et al. 2008; Yan et al. 2008). La stratégie de transgénèse ainsi mise au point est déjà testée avec succès chez d'autres espèces d'*Eimeria*, notamment *E. nieschulzi* qui infecte uniquement les entérocytes de l'intestin chez le rat (Kurt & Entzeroth, 2008). Cette avancée majeure, combinée aux données de séquençage, permet d'envisager pour la première fois l'obtention des premiers mutants d'*E. tenella*. Ces souches recombinées permettront de déterminer la fonction d'un gène *in vivo*, d'étudier l'interaction hôte-pathogène et pourront être de très bonnes souches vaccinales de virulence atténuée ; possédant un marqueur de résistance à une drogue donnée qui permettra de les identifier dans la nature. La recherche sur *Eimeria* est en pleine effervescence et a désormais les moyens d'étudier finement les mécanismes moléculaires mis en jeu dans l'interaction du parasite avec la cellule épithéliale.

LES PROTÉASES D'*EIMERIA* : DE NOUVELLES CIBLES THÉRAPEUTIQUES ?

Les études de biochimie et de biologie cellulaire menées sur les mécanismes d'invasion des cellules de l'hôte par les parasites apicomplexes modèles *T. gondii* et *P. falciparum*, ont montré le rôle majeur des protéases parasitaires à tous les niveaux du cycle infectieux. En effet, les protéases sont impliquées dans les premières étapes d'invasion, dans la survie intracellulaire ou encore dans la lyse de la cellule infectée (Que et al. 2002, 2007 ;

Salas *et al.* 1995; Blackman 2008; Brossier *et al.* 2005; Brossier *et al.* 2008; Drew *et al.* 2008). Les particularités structurales de ces protéases et leur implication dans les mécanismes de virulence en font des cibles thérapeutiques de choix. Les données de la littérature sur le rôle de protéases parasitaires dans la biologie des *Eimeria* sont peu nombreuses. Pourtant, des résultats obtenus avec l'utilisation d'inhibiteurs de protéases montrent une réduction du pouvoir invasif des sporozoïtes d'*E. tenella* dans des cultures cellulaires *in vitro* (Fuller & McDougald, 1990). Ce résultat encourageant suggère que, tout comme chez les autres parasites apicomplexes, les *Eimeria* expriment des protéases

impliquées dans les mécanismes d'invasion des cellules épithéliales et ceci, très tôt dans le cycle infectieux. Avec la technique de transfection mise au point chez les *Eimeria*, il est maintenant envisageable de créer des mutants affectés dans des gènes de protéases exprimés à des stades spécifiques de l'infection, afin de déterminer le rôle de ces protéases dans la biologie du parasite. La caractérisation biochimique fine de certaines de ces protéases pourrait permettre de développer de nouveaux agents anticoccidiens dont les actions viseraient à prévenir l'invasion, la multiplication intracellulaire du parasite ou encore la lyse des cellules infectées.

BIBLIOGRAPHIE

- Blackman, M.J. 2008. Malarial proteases and host cell egress: an 'emerging' cascade. *Cell Microbiol.* 10: 1925–34.
- Brossier, F., Jewett, T.J., Sibley, L.D., Urban, S. 2005. A spatially localized rhomboid protease cleaves cell surface adhesins essential for invasion by *Toxoplasma*. *Proc Natl Acad Sci. USA* 102: 4146–4151.
- Brossier, F., Starnes, G.L., Beatty, W.L., Sibley, L.D. 2008. Microneme rhomboid protease TgROM1 is required for efficient intracellular growth of *Toxoplasma gondii*. *Eukaryot Cell* 4: 664–4674.
- Clark, J.D., Billington, K., Bumstead, J.M., Oakes, R.D., Soon, P.E., Sopp, P., Tomley, F.M., Blake, D.P. 2008. A toolbox facilitating stable transfection of *Eimeria* species. *Mol Biochem Parasitol.* 162: 77–86
- Drew, M.E., Banerjee, R., Uffman, E.W., Gilbertson, S., Rosenthal, P.J., Goldberg, D.E. 2008. Plasmodium food vacuole plasmepsins are activated by falcipains. *J Biol Chem.* 283: 12870–12876.
- Fuller, A.L. & McDougald, L.R. 1990. Reduction in cell entry of *Eimeria tenella* (Coccidia) sporozoites by protease inhibitors, and partial characterization of proteolytic activity associated with intact sporozoites and merozoites. *J Parasitol.* 76: 464–467.
- Girard, F., Péry, P., Naciri, M., Quéré, P. 1999. Adjuvant effect of cholera toxin on systemic and mucosal immune responses in chickens infected with *E. tenella* or given recombinant parasitic antigen per os. *Vaccine* 17: 1516–1524.
- Kawazoe, U., Bordin, E.L., de Lima, C.A., Dias, L.A. 2005. Characterisation and histopathological observations of a selected Brazilian precocious line of *Eimeria acervulina*. *Vet Parasitol.* 131: 5–14.
- Kazanji, M., Laurent, F., Péry, P. 1994. Immune responses and protective effect in mice vaccinated orally with surface sporozoite protein of *Eimeria falciformis* in ISCOMs. *Vaccine.* 12: 798–804.
- Kurth, M. & Entzeroth, R. 2008. Reporter gene expression in cell culture stages and oocysts of *Eimeria nieschulzi* (Coccidia, Apicomplexa). *Parasitol Res.* 2008 sep 17. Epub ahead of print.
- Labbé, M., de Venevelles, P., Girard-Misguich, F., Bourdieu, C., Guillaume, A., Péry, P. 2005. *Eimeria tenella* microneme protein EtMIC3: identification, localisation and role in host cell infection. *Mol Biochem Parasitol.* 140: 43–53.
- McDougald, L.R. & Jeffers, T.K. 1976. *Eimeria tenella* (Sporozoa, Coccidia): Gametogony following a single asexual generation. *Science* 192: 258–259.
- Periz, J., Gill, A.C., Hunt, L., Brown, P., Tomley, F.M. 2007. The microneme proteins EtMIC4 and EtMIC5 of *Eimeria tenella* form a novel, ultra-high molecular mass protein complex that binds target host cells. *J Biol Chem.* 282: 16891–16898.
- Péry, P., Yvone, P., Laurent, F., Bessay, M. 1995. Vaccination against avian coccidiosis. *Vet Res.* 26: 215–216.
- Que, X., Ngo, H., Lawton, J., Gray, M., Liu, Q., Engel, J., Brinen, L., Ghosh, P., Joiner, K.A., Reed, S.L. 2002. The cathepsin B of *Toxoplasma gondii*, toxopain-1, is critical for parasite invasion and rhoptry protein processing. *J Biol Chem.* 277: 25791–25797.
- Que, X., Engel, J.C., Ferguson, D., Wunderlich, A., Tomavo, S., Reed, S.L. 2007. Cathepsin Cs are key for the intracellular survival of the protozoan parasite, *Toxoplasma gondii*. *J Biol Chem.* 282: 4994–5003.
- Réfega, S., Girard-Misguich, F., Bourdieu, C., Péry, P., Labbé, M. 2003. Gene discovery in *Eimeria tenella* by immunoscreening cDNA expression libraries of sporozoites and schizonts with chicken intestinal antibodies. *Vet Parasitol.* 113: 19–33.
- Salas, F., Fichmann, J., Lee, G.K., Scott, M.D., Rosenthal, P.J. 1995. Functional expression of falcipain, a *Plasmodium falciparum* cysteine proteinase, supports its role as a malarial hemoglobinase. *Infect Immun.* 63: 2120–2125.
- Shirley, M.W. & Bellatti, M.A. 1984. *Eimeria necatrix*: selection and characteristics of a precocious (and attenuated) line. *Avian Pathol.* 13: 657–668.
- Shirley, M.W. & Bellatti, M.A. 1988. Live attenuated coccidiosis vaccine: selection of a second precocious line of *Eimeria maxima*. *Res Vet Sci.* 44: 25–28.
- Shirley, M.W., Smith, A.L., Tomley, F.M. 2005. The biology of avian *Eimeria* with an emphasis on their control by vaccination. In *Advances in Parasitology*. (ed. J.R. Baker, R. Muller, D. Rollinson), 60: 285–324. Elsevier Academic press.
- Williams, R.B. 1999. A compartmentalized model for the estimation of the cost of coccidiosis to the world's chicken production industry. *Int J Parasitol.* 29: 1209–1229.
- Yan, W., Liu, X., Shi, T., Hao, L., Tomley, F.M., Suo, X. 2009. Stable transfection of *Eimeria tenella*: Constitutive expression of the YFP-YFP molecule throughout the life cycle. *Int J Parasitol.* 39 (1) : 109–117.