

APPLICATIONS PRATIQUES DE LA RECHERCHE DU VIRUS DE LA MALADIE DE MAREK PAR PCR A PARTIR DE PRELEVEMENTS D'ENVIRONNEMENT

Pinson Matthieu¹, Derieux Maxence², Croville Guillaume³, Lèbre Laetitia³, Delquigny Thomas⁴, Perreuil Guillaume⁴, Lemièrre Stéphane⁴, Belloc Catherine², Guérin Jean-Luc³

¹LABOVET CONSEIL – 15 rue Christophe Colomb - 85300 CHALLANS ; ²ONIRIS – Route de Gachet - 44300 NANTES ; ³ENVT – 23 chemin des Capelles - 31300 TOULOUSE

⁴BOEHRINGER INGELHEIM ANIMAL HEALTH – 29, avenue Tony Garnier - 69007 LYON
m.pinson@reseaucristal.fr

RÉSUMÉ

Le virus de la maladie de Marek (MDV) est très résistant dans le milieu extérieur et largement répandu dans les élevages de volailles. En routine, le diagnostic de la maladie de Marek se base sur les lésions macroscopiques et microscopiques mais leur description ne constitue pas un diagnostic de certitude. La qPCR pourrait étayer le diagnostic en cas de suspicion mais aussi permettre d'apprécier la présence du virus dans les élevages français. En effet, le virus a déjà été détecté avec succès par PCR à partir de prélèvements de poussières. Cette étude a pour objectif de rechercher les apports de différentes méthodes de prélèvement en explorant la charge virale dans les bâtiments voire en caractérisant le génome des virus détectés. 13 bâtiments de poulets de souche à croissance lente, ont été répartis en 3 groupes : groupe 1 = cas clinique en cours, groupe 2 = lot asymptomatique dans un même élevage qu'un cas clinique en cours, groupe 3 = lot asymptomatique. 3 méthodes de prélèvement d'environnement ont été comparées : aérobiocollecteur, chiffonnette et recueil poussière dans un sac. Une qPCR détectant Gallid alphaherpesvirus 2 (GaHV-2) a été réalisée sur tous les prélèvements. Le virus a été détecté dans tous les bâtiments. Pour les prélèvements par chiffonnette et sac, la charge virale était plus haute dans les bâtiments du groupe 1 que dans ceux du groupe 2, elle-même plus haute que dans ceux du groupe 3. Avec l'aérobiocollecteur, la charge virale était équivalente dans les deux premiers groupes mais était plus faible dans le troisième. La forte charge virale détectée dans les bâtiments du premier groupe a permis de séquencer le gène Meq des 6 virus provenant des cas cliniques. Quatre étaient identiques, provenant d'élevages avec des liens épidémiologiques avérés. Une interruption du motif PPPP a été détectée en position 216-219 dans tous les cas, constituant un marqueur potentiel de virulence. De plus, ces 6 virus sont génétiquement proches des GaHV-2 eurasiatiques. En conclusion, dans nos conditions d'étude, le prélèvement par chiffonnette et sac semblent mieux corrélés au statut clinique mais la chiffonnette s'avère le moyen le plus pratique. Cette étude a aussi mis en lumière la large présence de ce virus dans nos élevages et a permis de décrire les caractéristiques génétiques des virus mis en cause dans les 6 cas cliniques inclus.

ABSTRACT

Practical applications of Marek's disease virus detection by qPCR from dust samples

Marek's disease virus (GaHV-2) is resistant in the environment and widespread in poultry farms. Suspicion of Marek's disease is based on lesion description but that does not provide a definitive diagnosis. Use of qPCR could be used to assess the presence of the virus in poultry farms. The virus has already been successfully detected by PCR from dust samples. The aim of this study is to investigate the contribution of different sampling methods by exploring the viral load in poultry houses and characterising the genome of the viruses detected. 13 houses with broilers were divided into 3 groups: group 1 = current clinical case, group 2 = asymptomatic flock on the same farm as a current clinical case, group 3 = asymptomatic flock. 3 environmental sampling methods were tested: aerobiocollector, wipe and dust collection in a bag. A qPCR detecting Gallid alphaherpesvirus 2 (GaHV-2) was performed on all samples. GaHV-2 was detected in all houses. For wipe and bag sampling, the viral load was higher in group 1 houses than in group 2, and itself higher than in group 3. With the aerobiocollector, viral load was similar in the first two groups, but lower in the third. Meq genes could be sequenced in the 6 viruses from the clinical cases. An interruption in the PPPP motif was detected in all cases, constituting a potential virulence marker. In addition, these 6 viruses are genetically close to European MDVs. In conclusion, under our study conditions, wipe and bag sampling seem to correlate better with clinical status, but the wipe is the most practical method. This study also highlighted the widespread presence of this virus in our farms and enabled us to describe the genetic characteristics of the viruses involved in the 6 clinical cases included.

INTRODUCTION

La maladie de Marek est une maladie causée par l'infection d'un GaHV-2 (Gallid herpesvirus 2), un alphaherpesvirus ubiquitaire très résistant dans le milieu extérieur (Davidson 2020, Nair et al. 2020). Le diagnostic repose sur la description des lésions macroscopiques et microscopiques. Il peut être complété par une immunohistochimie caractérisant la population de lymphocytes infiltrés (Kurokawa 2020) ou détectant directement la protéine virale Meq (Amhed 2018). Les PCR quantitatives (qPCR) ont été développées ces dernières années et validées pour différents types de prélèvements (organes tumoraux, sang, plumes, poussière) (Baigent 2005, Baigent 2013, Islam 2006). La qPCR à partir de prélèvement d'environnement permet d'évaluer la charge virale en GaHV-2 dans un bâtiment avicole pour monitorer la vaccination ou connaître le statut du bâtiment vis-à-vis de la maladie de Marek (Kennedy et al., 2017; Ralapanawe et al., 2016; Walkden-Brown et al., 2013). L'objectif de ce travail est de mettre en évidence les applications pratiques de l'usage des poussières dans l'exploration de la maladie de Marek dans les élevages avicoles. Nous rechercherons notamment l'existence d'un lien entre la charge virale dans l'environnement d'un bâtiment et le statut clinique des oiseaux. Nous comparerons aussi trois méthodes de prélèvement de poussière. Enfin, si possible, le gène Meq des virus détectés sera séquencé pour analyse phylogénétique. Ce séquençage permet en plus d'avoir des indications sur le niveau de virulence des souches sauvages (Shamblin 2004, Renz 2012, Tian 2011).

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Sélection des élevages à prélever

Entre novembre 2022 et mars 2023, des bâtiments poulets de chair (ou poules reproductrices) de souche à croissance lente ont été recrutés pour être inclus dans l'étude. Les bâtiments sélectionnés ont été répartis en trois groupes. Le groupe 1 regroupe les bâtiments où une forte suspicion clinique de maladie de Marek a été établie par la description de lésions macroscopiques et microscopiques fortement évocatrices sur le lot en cours. Le groupe 2 regroupe les bâtiments d'un même élevage qu'un bâtiment du groupe 1 mais avec des poulets ne présentant aucun signe clinique ni lésion évocateurs de maladie de Marek. Enfin, le groupe 3 regroupe des bâtiments dans des élevages sans aucun signe ni lésion caractéristique mais susceptibles d'être contaminés par du GaHV-2 (historique récent de maladie de Marek ou baisse de performances dans un secteur géographique proche d'un élevage groupe 1).

1.2. Prélèvements d'environnement

Dans les bâtiments du groupe 1, les prélèvements d'environnement ont été effectués quelques semaines après l'établissement de la suspicion de maladie de Marek. Les bâtiments du groupe 2 ont été prélevés à ce

moment. Les bâtiments du groupe 3 ont été prélevés en fin de lot.

Trois méthodes de prélèvements ont été appliquées, les deux premières n'ayant à notre connaissance jamais été testées pour la détection de GaHV-2. La première méthode (COR) consiste à récupérer la poussière en suspension dans l'air à l'aide d'un aérobiocollecteur. Un Coriolis μ ® (Bertin Technologies) a ainsi été utilisé au débit de 300L/min pendant 10 min. La poussière a été recueillie dans un cône stérile contenant une solution d'eau déminéralisée avec 0.005% Triton X-100 (Sigma Aldrich) puis la solution a été transférée dans un tube stérile. La deuxième méthode (CHIF) consiste à récupérer des poussières sur une paroi verticale à l'aide d'une chiffonnette Sodibox 4002C SEC SECO DRY 32*17 cm®. La chiffonnette est passée sur les parois jusqu'à coloration totale par la poussière. La troisième méthode (POU) consiste à récupérer des poussières accumulées depuis plus longtemps sur un rebord horizontal en la récoltant dans un sac zip. Tous les prélèvements ont été stockés à -20°C avant analyse.

1.2. Détection du virus par qPCR

Les échantillons de poussière accumulée (CHIF et POU) ont été mis en solution dans du PBS : une chiffonnette dans 25 mL de PBS, 200 mg de poussière provenant des sacs zip dans 6 mL de PBS. L'ADN des 3 types d'échantillons a ensuite été extrait grâce au kit d'extraction par billes magnétiques Mag Fast Extraction Kit® (ID Gene). Les acides nucléiques ont ensuite été analysés par PCR quantitative en temps réel avec le kit Marek's disease duplex® (ID Gene) qui cible l'ensemble des GaHV-2 (virus pathogènes et souche CVI988). Enfin, 10 μ g d'albumine sérique bovine (BSA) ont été ajoutés dans chaque réaction de PCR pour contrer l'effet des inhibiteurs de PCR présents dans les fèces, la litière ou l'aliment. La charge virale sera estimée par la valeur de Ct.

1.3. Séquençage du gène Meq

Pour les échantillons provenant du groupe 1 avec de faibles Ct (donc charge virale élevée), le gène Meq a été amplifié par PCR conventionnelle en utilisant les amorces spécifiques décrites par Shamblin et al. La pureté des produits d'amplification obtenus a été évaluée par électrophorèse sur gel d'agarose. Un séquençage Sanger du gène Meq a ensuite été réalisé (sous-traitance) sur les échantillons purs. Ce séquençage nous a notamment permis de savoir si les virus détectés étaient d'origine vaccinale ou sauvages en les alignant sur la séquence CVI988. Un arbre phylogénétique a été construit, comparant nos séquences à des séquences disponibles dans la base de données NCBI. L'alignement des séquences a été fait avec le logiciel MAFFT version 7. L'arbre a été construit selon la méthode de neighbour-joining.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1. Description des élevages prélevés

Treize bâtiments provenant de 10 élevages ont été inclus dans l'étude. Les données des élevages (production, localisation, vaccination contre la maladie de Marek, âge lors de la visite) et les raisons de l'intégration de chaque bâtiment dans les groupes prédéfinis sont résumées dans le tableau 1. Le groupe 1 comprenait ainsi 6 bâtiments (D1, E1, F, J1, J2, K) appartenant à 5 élevages dont les poulets présentaient des lésions fortement évocatrices d'une forme tumorale de la maladie de Marek. Les bâtiments D2 et E2, où aucune suspicion n'a été émise, étaient respectivement dans le même élevage que D1 et E1. Les oiseaux présents dans les 5 bâtiments du groupe 3 (A, B, C, G, H) ne présentaient aucun signe clinique ni lésion évocateurs de maladie de Marek le jour des prélèvements.

2.2. Détection du virus par qPCR

Le virus de la maladie de Marek a été détecté dans tous les bâtiments via les 3 méthodes de prélèvement malgré 5 points d'analyse négatifs ($Ct > 40$). Ces 5 résultats sont potentiellement négatifs du fait de la présence d'inhibiteurs de PCR car ils correspondent à des échantillons issus de bâtiments dans lesquels les autres méthodes de prélèvement ont engendré des résultats positifs. Les résultats des qPCR exprimés en valeurs de Ct sont synthétisés dans la figure 1. Les charges virales obtenues à partir des prélèvements CHIF et POU étaient équivalentes et peuvent être interprétées de la même manière. Avec ces deux méthodes, la charge virale en GaHV-2 était plus élevée dans les bâtiments du groupe 1 que dans ceux du groupe 2, elle-même plus élevée que dans ceux du groupe 3. La charge virale en GaHV-2 détectée par la méthode COR récoltant de la poussière en suspension était plus faible dans les bâtiments du groupe 1 que celle détectée par les deux autres méthodes. Elle est par contre du même ordre de grandeur que celle détectée par la méthode COR dans les bâtiments du groupe 2. Enfin, la charge virale détectée sur les prélèvements COR dans les bâtiments du groupe 3 sont équivalentes aux deux autres méthodes.

Dans les bâtiments de notre étude contenant des poulets atteints de maladie de Marek, la charge virale évaluée à partir des prélèvements de poussière accumulée (CHIF et POU) est plus élevée que celle évaluée à partir d'aérosols (COR). Une différence de charge virale a déjà été notée entre une méthode utilisant un plateau collecteur prélevé puis nettoyé tous les sept jours et celle impliquant de récupérer de la poussière accumulée sur un rebord. Il y avait effectivement plus de GaHV-2 détecté avec la 2ème méthode, reflétant l'accumulation de poussière depuis le début du lot comparé aux plateaux qui ne capturent que de la poussière récemment déposée (Nguyen 2019). Un prélèvement de poussière accumulée semble adéquat pour espérer avoir une corrélation entre le statut clinique des animaux et la charge virale du bâtiment. Par rapport au prélèvement par raclage de poussière, la

chiffonnette présente deux avantages pratiques. C'est un moyen couramment utilisé en élevage et il ne présente pas de risque de contamination au laboratoire d'analyse. Le lieu de prélèvement n'influençant pas le niveau de détection du GaHV-2 (Nguyen 2019), elle peut être passée n'importe où dans le bâtiment.

La charge virale en GaHV-2 estimée par la valeur de Ct semble donc être liée au statut clinique du bâtiment avec la détection d'une plus forte charge virale dans les bâtiments suspects par rapport aux bâtiments du groupe 3. En effet, le lien entre le statut lésionnel d'un individu et la charge virale à partir de prélèvements d'organes tumoraux (Mete 2016) et de sang (Gimeno 2008) a été démontré. De plus, la relation entre la charge virale dans les poussières et la présence de lésions tumorales a été suggérée (Walkden-Brown 2013). Cependant, une forte charge virale n'est pas obligatoirement synonyme de maladie de Marek mais doit plutôt être considérée comme un indicateur d'une pression virale élevée dans le bâtiment (Baigent 2013).

Dans les bâtiments du groupe 2, les Ct étaient plus bas dans les aérosols que dans la poussière accumulée, pouvant traduire une augmentation récente de la charge virale, probablement liée aux particules virales excrétées par les poulets malades du bâtiment voisin du groupe 1.

L'appréciation de la charge virale par la valeur de Ct gagnerait à être plus fiable, notamment par une calibration plus stricte de la méthode préconisée (CHIF). L'absence de quantification absolue par la méthode de PCR en temps réel constitue la principale limite de ce travail, néanmoins la PCR digitale est une alternative à explorer.

2.3. Séquençage du gène Meq

Pour les 6 bâtiments du groupe 1, la forte charge virale a permis l'amplification et le séquençage du gène Meq. Le gène Meq des 4 GaHV-2 détectés dans les bâtiments D, J1, J2 et K ont la même séquence traduite en acides aminés alors que ceux détectés dans les élevages E et F ont une séquence unique (Tableau 2).

L'arbre phylogénétique construit à partir des séquences du gène Meq de différents virus de la maladie de Marek est représenté par la figure 2. Les virus provenant des bâtiments D, F, J1, J2 et K sont dans une branche principalement constituée de virus isolés en Asie orientale et Amérique du Sud mais aussi un virus isolé dans un élevage en Italie. Le virus provenant de l'élevage E est dans un autre cluster, très proche de nombreux virus récemment isolés en Italie et Pologne. Nos six virus sont plus éloignés des virus virulents nord-américains représentés ici par les souches MD5 et 648A. Cette proximité génétique avec les virus sauvages circulant en Europe et en Asie renforce l'hypothèse d'une évolution séparée de la virulence des MDV avec l'existence de deux lignées indépendantes : une eurasienne et une nord-américaine (Trimpert 2017).

La séquence répétée riche en prolines (succession de 4 prolines, ou « PPPP ») en position 216 sur le gène

Meq est interrompue dans toutes les souches que nous avons séquencées, avec des substitutions d'acides aminés variables selon les souches : P217A pour les GaHV-2 détectés dans les bâtiments D, J1, J2 et K ; P218S pour le virus de l'élevage E ; P217L et P218A pour le virus de l'élevage F. Bien que l'analyse génétique ne soit pas une méthode de pathotypage, elle nous permet néanmoins de déceler différentes caractéristiques indicatrices du niveau de virulence des souches séquencées (Shamblin 2004, Tian 2011, Renz 2012). Il apparaît que le nombre de motifs PPPP constitue le marqueur faisant le plus consensus. Il semble en effet inversement proportionnel au niveau de virulence (Shamblin 2004, Renz 2012). Dans notre étude, les 6 virus présentent une ou des substitutions dans leurs séquences en acides aminés interrompant le motif PPPP de la position 216-219. Ils comptent donc tous 4 motifs PPPP, ce qui est un indicateur de haute virulence. De plus, deux des quatre mutations caractéristiques des MDVs virulents circulant en Chine (Tian 2011) ont été décelées ici : D80Y et V115A. Il est intéressant de voir que les interruptions des motifs PPPP en position 153 (P153Q) et 176 (P176A), régulièrement décrites pour les virus très virulents nord-américains (Shamblin 2004), n'ont pas été observées dans notre étude.

CONCLUSION

La poussière représente un prélèvement de choix lors de l'exploration de la maladie de Marek. En effet, la charge virale semble liée au statut clinique du bâtiment. La collecte de poussières accumulées par chiffonnette représente la meilleure technique pour détecter le virus avec suffisamment de certitude, au vu des résultats obtenus et de la praticité de la méthode. Les souches sauvages de GaHV-2 continuent de circuler en France dans les élevages de poulets de chair à croissance lente et sont notamment responsables de formes tumorales de maladie de Marek, malgré les schémas de vaccinations en place. Grâce au séquençage du gène Meq, nous pouvons décrire que les virus isolés à partir de ces cas cliniques sont proches des virus circulant en Eurasie avec un probable niveau de virulence élevé. Cette étude pilote confirme que la détection des GaHV-2 dans les bâtiments avicoles pourra nous permettre à l'avenir d'améliorer notre exploration de cette maladie. Le développement d'une PCR DIVA différenciant les souches CVI988 des souches sauvages permettrait d'éviter un séquençage aujourd'hui nécessaire. Enfin, la calibration du prélèvement par chiffonnette permettrait une corrélation fiable entre la valeur de Ct et la charge virale.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abd-Ellatieff, H. A., Abou Rawash, A. A., Ellakany, H. F., Goda, W. M., Suzuki, T., & Yanai, T., 2018. Avian Path., 47(1), 47-57.
- Ahmed, H., Mays, J., Kiupel, M., & Dunn, J. R., 2018. Avian Path., 47(4), 364-374.
- Baigent, S. J., Petherbridge, L. J., Howes, K., Smith, L. P., Currie, R. J., & Nair, V. K., 2005. Journal of virological methods, 123(1), 53-64.
- Baigent, S. J., Kgosana, L. B., Gamawa, A. A., Smith, L. P., Read, A. F., & Nair, V. K., 2013. Avian Dis., 57(2s1), 440-447.
- Davidson I., 2020. Animals., (10), 1319.
- Gimeno, I. M., Cortes, A. L., & Silva, R. F., 2008. Avian Dis., 52(2), 203-208.
- Islam, A., Cheetham, B. F., Mahony, T. J., Young, P. L., & Walkden-Brown, S. W., 2006. Journal of virological methods, 132(1-2), 127-134.
- Kennedy, D. A., et al., 2017. Avian Dis. 61(2): 153-164
- Kurokawa A., Yamamoto Y., 2020. Vet. immunology and immunopathology (228), 110088
- Lachheb, J., Mastour, H., Nsiri, J., Kaboudi, K., Choura, I., Ammouna, F., ... & Ghram, A., 2020. Archives of virology, 165(11), 2589-2597.
- Mescolini, G., Lupini, C., Felice, V., Guerrini, A., Silveira, F., Cecchinato, M., & Catelli, E., 2019. Poult. Sci., 98(8), 3130-3137.
- Mete, A., Gharpure, R., Pitesky, M. E., Famini, D., Sverlow, K., & Dunn, J., 2016. Avian dis., 60(4), 826-836.
- Nair V, Gimeno I, Dunn J., 2020. In : Marek's Disease. In: Diseases of poultry 14th ed. p. 550-587.
- Nguyen, T. V., Ahaduzzaman, M., Campbell, D. L., Groves, P. J., Walkden-Brown, S. W., & Gerber, P. F., 2019. Vet. microbiology, 236, 108393.
- Ralapanawe, S., Renz, K. G., Burgess, S. K., & Walkden-Brown, S. W., 2016. Aust. Vet. journal, 94(9), 329-337.
- Renz, K. G., et al., 2012. Avian Path, 41(2), 161-176.
- Shamblin, C. E., Greene, N., Arumugaswami, V., Dienglewicz, R. L., & Parcells, M. S., 2004. Vet. microbiology, 102(3-4), 147-167.
- Tian, M., et al., 2011. Virology journal, 8(1), 1-11.
- Trimpert, J., et al., 2017. Evolutionary Applications, 10(10), 1091-1101.
- Walkden-Brown, S. W., Islam, A., Groves, P. J., Rubite, A., Sharpe, S. M., & Burgess, S. K., 2013. Avian dis., 57(2s1), 544-554.
- Yehia, N., El-Sayed, H. S., Omar, S. E., Erfan, A., & Amer, F., 2021. Vet. World, 14(5), 1342.
- Yilmaz, A., et al., 2020. British poult. Sci., 61(5), 523-530.

Tableau 1. Présentation des 13 bâtiments inclus dans l'étude

Elevage-Bâtiment	Date du prélèvement	Production	Département	Vaccin Marek	Âge (sem)	Catégorie	Critère de catégorisation
A	15/11/2022	Poulet	85	HVT	12	Groupe 3	Forme encéphalitique en 2019
B	26/11/2022	Poulet	85	HVT	12	Groupe 3	Forme encéphalitique en 2019
C	01/12/2022	Poulet	35	HVT	12	Groupe 3	Baisse de performances, proche d'autres élevages du groupe 1
D1	01/12/2022	Chapon	35	HVT + CVI988	18	Groupe 1	Forme tumorale viscérale
D2	01/12/2022	Chapon	35	HVT + CVI988	18	Groupe 2	Situé à 10 mètres de D1
E1	01/12/2022	Chapon	35	HVT + CVI988	18	Groupe 1	Forme tumorale viscérale
E2	01/12/2022	Chapon	35	HVT + CVI988	18	Groupe 2	Situé à 100 mètres de E1
F	14/12/2022	Poulet	45	HVT + RN1250	12	Groupe 1	Forme tumorale viscérale
G	12/01/2023	Poulet	85	CVI988	22	Groupe 3	Forme tumorale viscérale en janv 2022
H	14/03/2023	Poule reproduction	72	HVT + CVI988	48	Groupe 3	Forme tumorale sur 1 oiseau 2 mois auparavant, RAS depuis
J1	13/02/2023	Poulet	35	HVT	11	Groupe 1	Forme tumorale viscérale
J2	13/02/2023	Poulet	35	HVT	11	Groupe 1	Forme tumorale viscérale
K	02/02/2023	Poulet	35	Aucun	15	Groupe 1	Forme tumorale viscérale

Tableau 2. Mutations décrites dans les séquences déduites en acides aminés de nos virus par rapport à la souche CVI988

Meq position	71	80	110	115	217	218	273
CVI988	S	D	C	V	P	P	V
D1, K, J1, J2	A	Y	.	A	A	.	.
E1	A	Y	S	.	.	S	.
F	A	Y	.	A	L	A	A

Figure 1. Résultats de la qPCR GaHV-2 en fonction de la catégorisation des bâtiments prélevés (rouge = groupe 1, jaune = groupe 2, vert = groupe 3)

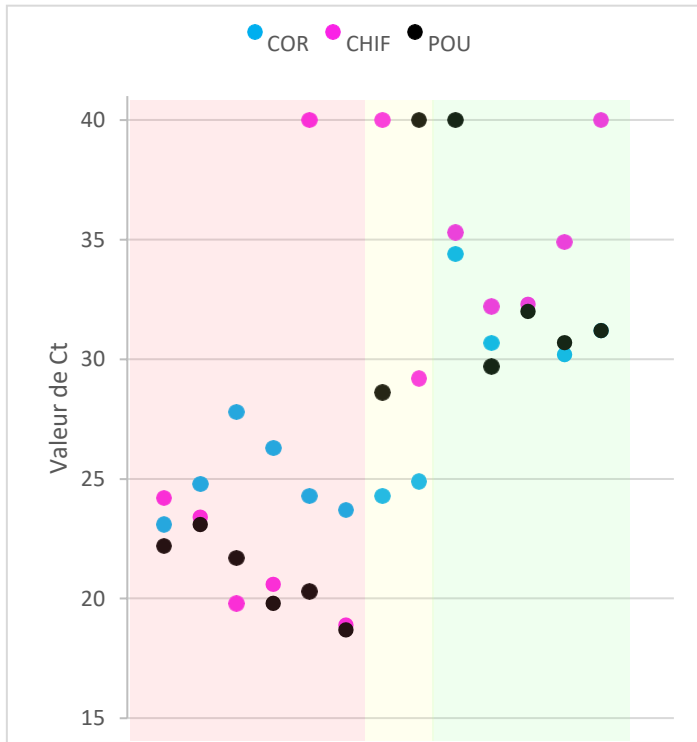


Figure 2. Arbre phylogénétique basé sur les séquences nucléotidiques du gène Meq de nos 5 virus et de 36 GaHV-2 de la base de données NCBI

