

ÉMERGENCE DE RÉOVIRUS AVIAIRES ASSOCIÉS AUX TÉNOSYNOVITES DANS LES FILIÈRES POULET LABEL EN FRANCE

**Guillaume Croville, Mattias Delpont, Jessica Genin, Luc Robertet, Maxence Delverdier,
Marie-Noëlle Lucas, Jean-Luc Guerin**

¹*Université de Toulouse, ENVT, INRA, UMR IHAP, 31076 Toulouse, France
g.croville@envt.fr et jl.guerin@envt.fr*

RÉSUMÉ

Les réovirus aviaires sont responsables de différentes maladies chez le poulet dont l'une des plus caractérisée est la ténosynovite virale. La ténosynovite virale est une entité émergente des poulets de chair, entraînant des pertes économiques considérables dans le monde entier. De nombreux variants, appelées génotypes, émergent et remettent en cause l'efficacité des vaccins commerciaux.

En 2016, une nouvelle émergence s'est produite chez les poulets de chair label dans le Sud-Ouest de la France et 34 cas ont été inclus dans une enquête de terrain.

Les 11 troupeaux atteints présentaient une incidence de boiteries modérée à très élevée, atteignant entre 50 et 100% des oiseaux et apparaissant dès l'âge de trois à quatre semaines. Les oiseaux affectés présentaient un gonflement mono- ou bilatéral du tendon gastrocnémien. Le tableau histopathologique a confirmé la suspicion pathologique de ténosynovite d'étiologie virale. Aucune autre lésion macroscopique n'a pu être observée sur les oiseaux affectés. Sur les 34 cas inclus dans l'enquête, 15 virus ont pu être isolés, dont huit avec un effet cytopathogène et leur gène *sigma C* a été séquencé. Trois isolats viraux appartiennent au génotype 1 et 12 au génotype 4. Les 12 virus de génotype 4 sont très proches génétiquement. L'analyse ciblée de la structure de six sites épitopiques de *sigma C* a confirmé une très forte divergence avec les souches vaccinales de génotype 1, ce qui confirme un défaut de protection croisée conférée par les vaccins commerciaux.

ABSTRACT

Avian reovirus outbreak associated with tenosynovitis in the French Label certified poultry production.

Avian reoviruses are responsible for various diseases in chicken, one of the most studied being viral tenosynovitis. Viral tenosynovitis is an emerging condition in broilers, causing significant economic losses worldwide. Many variants, referred to as genotypes, are emerging around the world and are challenging the effectiveness of commercial vaccines.

In 2016, a new emergence occurred in label broilers in south-west France and 34 cases were included in a field survey.

The 11 affected herds had a moderate to very high incidence of lameness, reaching nearly 50 to 100% of the birds and appearing as early as 3 to 4 weeks of age. Affected birds showed mono- or bilateral swelling of the gastrocnemius tendon. Histopathology confirmed the pathological suspicion of tenosynovitis of viral etiology. No other macroscopic lesions could be observed on the affected birds. Of the 34 cases included in the survey, 15 viruses were isolated, 8 with cytopathic effect and their *sigma C* gene were sequenced. Three viral isolates belong to genotype 1 and 12 to genotype 4. The 12 genotype 4 viruses are very closely related on the basis of their genetic sequences. Targeted analysis of the structure of 6 *sigma C* epitopic sites confirmed a very strong divergence with genotype 1 vaccine strains, confirming an expected lack of cross-protection conferred by commercial vaccines.

INTRODUCTION

Les virus impliqués dans la réovirose aviaire font partie de la famille des *Reoviridae* (appelés plus communément Réovirus), genre *Orthoreovirus* (1). Les réovirus sont des virus non-enveloppés à génome segmenté à ARN double-brin, possédant une capsid icosaédrique comportant deux ou trois couches protéiques. La traduction du génome des réovirus aviaires conduit à la formation de 12 produits :

- huit protéines de structure du virus : elles seront parties intégrantes de la descendance virale
- quatre autres protéines, dites non-structurales : elles sont retrouvées dans les cellules infectées mais pas dans les virions matures (2). Les protéines codées à partir des 10 fragments de génome L, M et S sont respectivement nommées λ , μ , σ . Une lettre est ensuite assignée à chaque protéine en fonction de sa capacité de migration sur gel d'électrophorèse, inversement à l'ordre alphabétique.

Cette étude s'est focalisée sur l'apparition de nouveaux réovirus de génotype 1 et 4 dans le Sud-Ouest de la France.

La population ciblée pour l'étude est la filière *Gallus* sous signe de qualité, qui correspond à des individus particulièrement à risque pour la réovirose, pour deux raisons :

- Les poulets Label Rouge sont élevés sur une période plus longue que des poulets standards (respectivement 81-84 jours contre 39-42 jours). Cet itinéraire technique favorise l'installation des lésions de ténosynovites, qui apparaissent au bout de quelques semaines d'évolution.

- Le poids constitue également un facteur de risque : les contraintes mécaniques exercées sur les tendons déjà fragilisés par l'inflammation peuvent aggraver les lésions et conduire à la rupture tendineuse.

Dans d'autres contextes, des poulets lourds, voire standards peuvent également être affectés.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Critères d'inclusion des élevages dans l'étude

Sur la période 2016-2018, 11 élevages du Sud-Ouest de la France (7 élevages en 2016 et 4 en 2018) ont fait l'objet d'un suivi par la clinique aviaire de l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse dans le cadre de suspicions de réovirose.

La totalité était des élevages de poulets Label Rouge élevés en moyenne sur 84 jours.

Le jour de la visite, les animaux étudiés étaient âgés 35 à 78 jours, la moyenne se situant autour de 57 jours. La densité était de 11 animaux/m² sur l'ensemble des élevages.

Sur les 11 élevages, sept provenaient de poules reproductrices vaccinées avec un vaccin FILAVAC Réo K12523 variant 2011.

1.2. Analyse virologique

Ces analyses ont été réalisées d'une part sur les tendons prélevés après les visites d'élevages et d'autre part sur des prélèvements adressés par des vétérinaires avicoles du Sud-Ouest de la France.

Au final, 34 prélèvements de tendons ont été mis en culture et analysés en RT-PCR conventionnelle ciblant le segment sigma C des réovirus aviaire (3).

Les tendons ont été broyés au mortier et au sable de Fontainebleau avant d'être mis à incuber sur cellules LMH (cellules tumorales de foie de poulet).

Après cinq jours d'incubation ou lorsqu'un ECP était observé, les cellules et la totalité du surnageant de culture étaient récupérés et conservés à -80°C.

Pour réaliser les passages suivants, le protocole était répété à partir de l'ajout du broyat sur les cellules en faisant subir trois cycles de congélation/décongélation au surnageant récolté au passage précédent, avant l'infection des cellules LMH.

Jusqu'à quatre passages ont ainsi été réalisés, un effet cytopathogène étant d'ordinaire observé après trois passages.

Le suivi de l'infection était réalisé par PCR quantitative en temps réel à l'aide d'amorces ciblant le segment M3. L'analyse phylogénétique et la classification en génotypes (4) était réalisée après séquençage Sanger du segment *Sigma C*. Ce dernier était amplifié au préalable par PCR conventionnelle avec les amorces P1 et P4 (3), ce segment étant le plus variable chez les réovirus (5) son séquençage permet une distinction fine entre les différentes souches de réovirus.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

Lors des 11 visites d'élevages, la totalité des lots atteints présentait des boiteries plus ou moins marquées avec un pourcentage du troupeau atteint allant de 10-15% à 100% (moyenne à 40%).

Après autopsies et examens histologiques, les lésions macroscopiques et microscopiques mettaient en évidence des ténosynovites chroniques, avec des tendons œdématisés ou indurés expliquant les boiteries et quelques lésions d'entérites.

Ce tableau clinique est typique d'un phénomène d'arthrite virale à réovirus et est similaire à d'autres foyers décrits auparavant (6,7).

Sur les 34 prélèvements testés en culture cellulaire, trois ont montré un effet cytopathogène (**Figure 1**) à partir du deuxième passage, huit à partir du troisième passage et cinq à partir du quatrième passage.

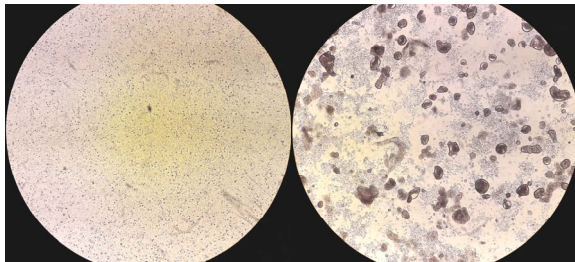


Figure 1 : À gauche : tapis cellulaire de LMH non infectés. À droite : effet cytopathogène typique des réovirus aviaires sur cellules LMH.

Après mise en culture, 18 échantillons se sont révélés positifs en RT-PCR. En raison de charges virales très faibles, six échantillons ne montraient pas d'ECP sur culture cellulaire mais ont tout de même été testés positifs en PCR quantitative en temps réel.

À noter que trois prélèvements ont été directement testés positifs en RT-PCR, sur les broyats de tendons sans passage par la culture cellulaire. L'ensemble des résultats est présenté dans le **tableau 1**.

Au final, 18 isolats viraux ont pu être séquencés et classés dans l'un des cinq génotypes décrits à ce jour. Ainsi, parmi les 18 échantillons séquencés, 15 ont été reliés au génotype 4 (12 prélèvements de 2016 et trois de 2017) et trois au génotype 1 (un échantillon en 2016 et deux en 2018) (**Figure 2**).

Les deux séquences d'acides aminés des échantillons L18-006 et L18-018 font partie du génotype 1 et sont proches de la souche 11-12523, souche avec laquelle les individus de ces troupeaux ont été vaccinés.

La comparaison des épitopes au niveau de la protéine *sigma C* de ces souches pourrait apporter un élément de réponse à l'apparition de signes cliniques malgré la vaccination avec une souche proche au plan phylogénétique.

En première intention, l'alignement des épitopes s'est fait avec les trois souches précédemment citées et une souche de chaque génotype (**Figure 3**).

Au final, les souches L18-006 et L18-018 présentent 99% d'identité entre elles. Elles possèdent également les mêmes substitutions d'acides aminés avec la souche 11-12523 à savoir :

- En position 176 : un acide aspartique (acide aminé chargé) chez la souche 11-12523, substituée par une arginine (non chargé) dans les souches L18-006 et L18-018.
- En position 236 : une sérine (acide aminé polaire), substituée par une glycine (non polaire).

- En position 292 : une sérine (polaire) est substituée par une valine (aliphatique et non polaire).

CONCLUSION

Des élevages de poulets Label Rouge du Sud-Ouest de la France atteints de réovirose ont été inclus dans une étude de recherche clinique. Ces cas cliniques, inclus sur la période 2016-2018, se caractérisaient principalement par des boiteries sévères (gonflement des tendons gastrocnémiens), touchant 35 à 40% du lot en moyenne, une hétérogénéité marquée et des retards de croissance.

L'isolement et l'analyse génétique du gène *sigma C* a montré que cette émergence est causée par des réovirus apparentés au génotype 4, selon la classification de Kant, 2003. Une analyse spécifique des sites épitopiques suggère que les virus isolés dans cette étude présentent des polymorphismes tels qu'une protection conférée par les souches vaccinales commerciales appartenant au génotype 1 est très improbable. Des essais de séroneutralisation permettraient de mieux évaluer les protections croisées. Le contrôle de la maladie par la vaccination est compromis par la variabilité génétique et l'échappement à la neutralisation (6,8,9). Une adaptation continue des souches incluses dans les formulations vaccinales est une option largement pratiquée dans d'autres pays.

Plus largement, l'émergence globale de ténosynovites à réovirus dans les grands bassins de production du poulet de chair dans le monde n'est pas expliquée. Cette émergence justifierait des travaux de fond pour mieux connaître la circulation réelle des réovirus, pathogènes ou non, et mieux caractériser les virus au plan génétique pour identifier les facteurs d'émergence et de pathogénicité.

Tableau 1 : Récapitulatif des résultats de mise en culture cellulaire, RT-PCR (3) et génotypage des 34 prélèvements analysés

Référence	RT-PCR sur broyat	P1 LMH	P2 LMH	P3 LMH	P4 LMH	RT-PCR après culture	Séquençage sigma C
16-089	POS	NEG	POS	POS	Non réalisé	POS	Cluster 4
16-090	NEG	NEG	POS	POS	POS	POS	Cluster 4
16-091	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	POS	Cluster 4
16-092	NEG	NEG	NEG	NEG	Non réalisé	NEG	Non réalisé
16-093	NEG	NEG	NEG	NEG	Non réalisé	NEG	Non réalisé
16-105	NEG	NEG	NEG	POS	Non réalisé	POS	Cluster 4
16-111	NEG	NEG	NEG	POS	Non réalisé	POS	Cluster 4
16-084	POS	Non réalisé	Non réalisé	Non réalisé	Non réalisé	Non réalisé	Cluster 4
16-118	NEG	NEG	NEG	POS	Non réalisé	POS	Cluster 1
16-094	NEG	NEG	NEG	POS	Non réalisé	POS	Cluster 4
16-094	NEG	NEG	NEG	NEG	Non réalisé	NEG	Non réalisé
16-095	NEG	NEG	NEG	NEG	Non réalisé	NEG	Non réalisé
16-095	NEG	NEG	NEG	NEG	Non réalisé	NEG	Non réalisé
16-096	NEG	NEG	NEG	NEG	Non réalisé	NEG	Non réalisé
16-096	NEG	NEG	NEG	NEG	Non réalisé	NEG	Non réalisé
16-097	NEG	NEG	POS	POS	Non réalisé	POS	Cluster 4
16-097	NEG	NEG	NEG	NEG	Non réalisé	POS	Cluster 4
16-097	NEG	NEG	NEG	NEG	Non réalisé	NEG	Non réalisé
16-097	NEG	NEG	NEG	NEG	Non réalisé	POS	Cluster 4
16-097	NEG	NEG	NEG	NEG	Non réalisé	POS	Cluster 4
16-098	NEG	NEG	NEG	NEG	Non réalisé	POS	NEG
16-098	NEG	NEG	NEG	POS	Non réalisé	POS	Cluster 4
16-098	NEG	NEG	NEG	NEG	Non réalisé	POS	NEG
16-099	NEG	NEG	NEG	NEG	Non réalisé	NEG	Non réalisé
16-099	NEG	NEG	NEG	NEG	Non réalisé	POS	NEG
16-099	NEG	NEG	NEG	NEG	Non réalisé	NEG	Non réalisé
17-022	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	POS	Cluster 4
17-022	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	POS	Cluster 4
17-022	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	POS	Cluster 4
18-001	NEG	NEG	NEG	NEG	Non réalisé	NEG	Non réalisé
18-002	POS	Non réalisé	Non réalisé	Non réalisé	Non réalisé	Non réalisé	Cluster 1
18-003	NEG	NEG	NEG	NEG	Non réalisé	NEG	Non réalisé
18-004	NEG	NEG	NEG	NEG	Non réalisé	NEG	Non réalisé
18-005	POS	Non réalisé	Non réalisé	Non réalisé	Non réalisé	Non réalisé	Cluster 1

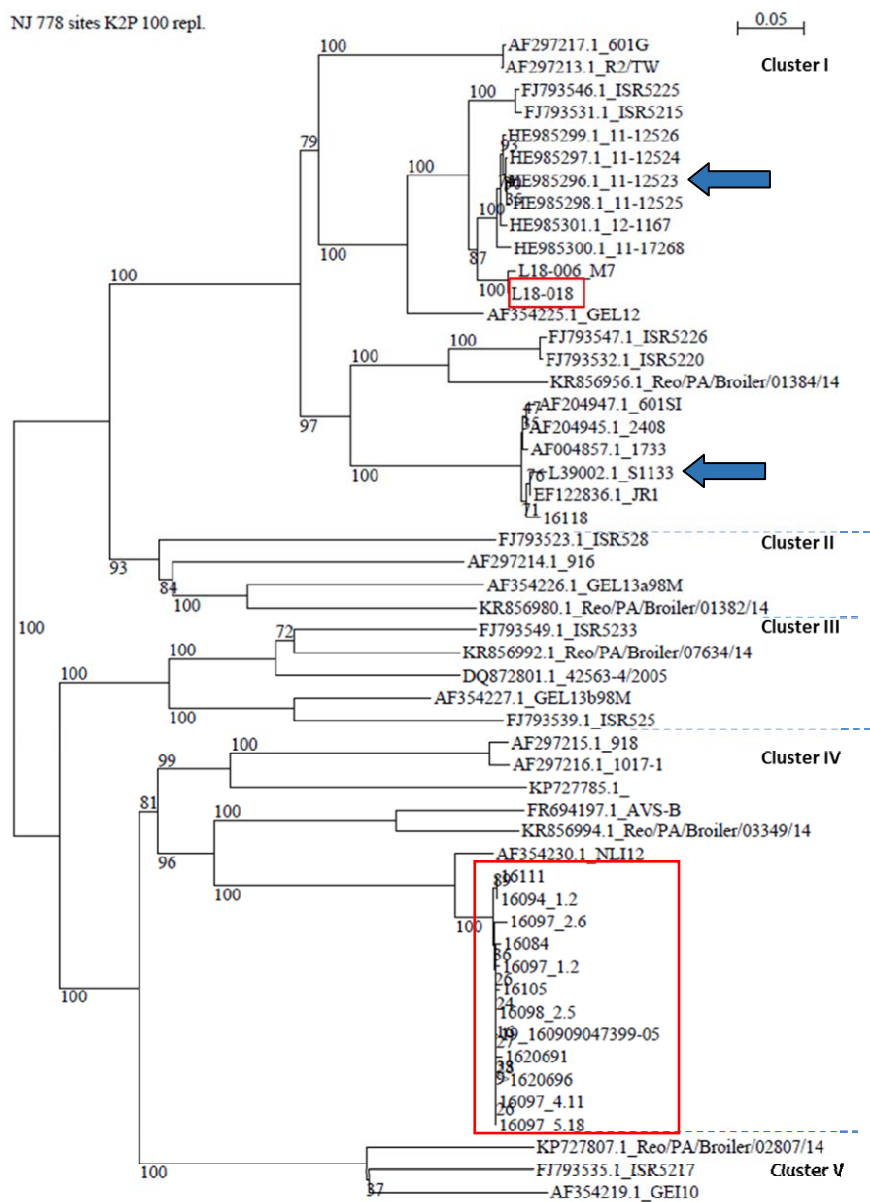


Figure 2 : Arbre phylogénétique regroupant les différents isolats de 2016 et 2018. Encadrés en rouge : isolats décrits dans ce travail. Flèches bleues : souches vaccinales.

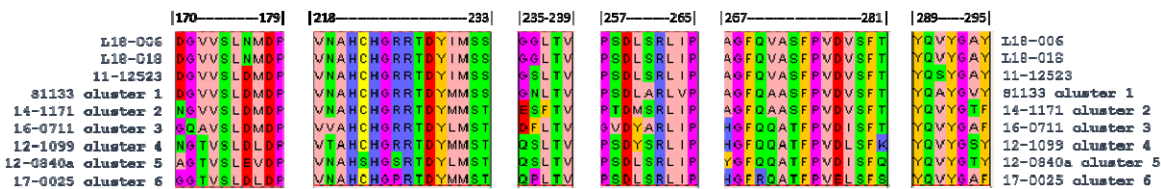


Figure 3 : Alignement des résidus d'acides aminés des régions antigéniques de la protéine sigma C.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Viruses IC on T of, King AM. Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier; 2011. 1463 p.
2. Martínez-Costas J, Grande A, Varela R, García-Martínez C, Benavente J. Protein architecture of avian reovirus S1133 and identification of the cell attachment protein. J Virol. 1997 Jan;71(1):59–64.
3. Kant A, Balk F, Born L, van Roozelaar D, Heijmans J, Gielkens A, et al. Classification of Dutch and German avian reoviruses by sequencing the sigma C protein. Vet Res. 2003 Apr;34(2):203–12.
4. Goldenberg D, Pasmanik-Chor M, Pirak M, Kass N, Lublin A, Yeheskel A, et al. Genetic and antigenic characterization of sigma C protein from avian reovirus. Avian Pathol. 2010 Jun;39(3):189–99.
5. Guardado Calvo P, Fox GC, Hermo Parrado XL, Llamas-Saiz AL, Costas C, Martínez-Costas J, et al. Structure of the carboxy-terminal receptor-binding domain of avian reovirus fibre sigmaC. J Mol Biol. 2005 Nov 18;354(1):137–49.
6. Troxler S, Rigomier P, Bilic I, Liebhart D, Prokofieva I, Robineau B, et al. Identification of a new reovirus causing substantial losses in broiler production in France, despite routine vaccination of breeders. Vet Rec. 2013 May 25;172(21):556.
7. Ayalew LE, Gupta A, Fricke J, Ahmed KA, Popowich S, Lockerbie B, et al. Phenotypic, genotypic and antigenic characterization of emerging avian reoviruses isolated from clinical cases of arthritis in broilers in Saskatchewan, Canada. Scientific Reports. 2017 Jun 15;7(1):3565.
8. Lublin A, Goldenberg D, Rosenbluth E, Heller ED, Pitcovski J. Wide-range protection against avian reovirus conferred by vaccination with representatives of four defined genotypes. Vaccine. 2011 Nov 3;29(47):8683–8.
9. Sellers HS. Current limitations in control of viral arthritis and tenosynovitis caused by avian reoviruses in commercial poultry. Vet Microbiol. 2017 Jul;206:152–6.