

ETUDE EXPERIMENTALE DE LA CINETIQUE DE TRANSMISSION D'UNE SOUCHE EUROPEENNE DU CORONAVIRUS DE LA DINDE SUR DINDONNEAUX EOPS

Paul Brown^{1,2}, Celine Courtilon^{1,2}, Chantal Allée^{1,2}, Anthony Vendembeuche³, Michel Amelot³, Mathieu Andraud⁴, Nicolas Rose⁴ and Nicolas Eterradossi^{1,2}

¹Unité VIPAC, Agence Nationale de Sécurité Sanitaire (ANSES), Laboratoire de Ploufragan-Plouzané, Université Européenne de Bretagne, BP 53-22440 PLOUFRAGAN, France

²EPICOREM Consortium, Université de Caen, Unité de Recherche Risques Microbiens (U2RM), F-14000 CAEN, France

³Unité SELEAC, Agence Nationale de Sécurité Sanitaire (ANSES), Laboratoire de Ploufragan-Plouzané, Université Européenne de Bretagne, BP 53-22440 PLOUFRAGAN, France

⁴Unité UBEP, Agence Nationale de Sécurité Sanitaire (ANSES), Laboratoire de Ploufragan-Plouzané, Université Européenne de Bretagne, BP 53-22440 PLOUFRAGAN, France

paul.brown@anses.fr

RÉSUMÉ

Depuis plusieurs décennies, de nombreux virus (réo-, adéno-, picorna-, corona-, astrovirus, etc.) ont été associés à des cas de « poult enteritis complex » (PEC), principalement dans des infections mixtes. Bien connu aux Etats-Unis depuis les années 1970 en tant qu'agent de la maladie de la crête bleue ou « bluecomb », le coronavirus de la dinde n'a par contre pas été détecté en Europe avant 2001. En 2008, un coronavirus (Fr-TCoV 080385d) a été isolé à partir de dindonneaux présentant des signes cliniques compatibles avec PEC. Dans des études publiées en 2011 et plus récemment en 2016, l'analyse de la séquence de génome entier de ce virus a démontré l'existence de recombinaisons complexes entre la souche française, les souches américaines, un coronavirus européen isolé sur la pintade et des souches du virus de la bronchite infectieuse. L'étude présentée vise à déterminer les propriétés de transmission du Fr-TCoV en évaluant sa dose minimale infectieuse chez le dindonneau EOPS et sa vitesse de reproduction (R0) en conditions expérimentales. Les résultats ont révélé i) que le virus était encore infectieux au-delà de la limite de détection du génome en utilisant une qRT-PCR bien caractérisée (Maurel et al., 2011) pour les coronavirus aviaires (AvCoV), ii) que la transmission horizontale était extrêmement rapide (dès 10 heures), et iii) que le génome viral était détecté dans le contenu intestinal jusqu'à cinq semaines post-inoculation. Une aussi longue durée d'excrétion a également été documentée pour les TCoV aux Etats-Unis et des études complémentaires sont en cours afin de déterminer si le virus détecté reste infectieux pendant toute la durée d'excrétion digestive du génome viral.

ABSTRACT

Kinetics of a european turkey coronavirus (fr tcov) during experimental infection of spf turkeys

For several decades, numerous viruses (reo-, adeno-, picorna-, corona-, astroviruses etc), mostly in mixed infections, have been found worldwide to be associated with poult enteritis complex (PEC). Although known in the USA since the 1970 as the agent of bluecomb, no coronavirus was detected in Europe in turkeys until 2001. Since 2003, an increasing number of turkey flocks exhibiting clinical signs compatible with PEC have been observed in different geographical locations in France and presented a major concern for turkey production. In 2008 a coronavirus (Fr-TCoV 080385d) was isolated from turkey poults exhibiting clinical signs compatible with PEC. In studies published in 2011 and most recently in 2016, analysis of the full length sequence of this virus has demonstrated a complex recombination history between Fr-TCoV 080385d, US TCoVs, a European coronaviruses isolated from guinea fowl and IBVs. The study describes the transmission properties of Fr-TCoV by evaluating its minimal infectious dose and attempts to estimate its reproductive rate (R0) in SPF turkeys under experimental conditions. The results revealed i) that the virus was still infectious beyond the limit of genome detection using a well-characterized qRT-PCR (Maurel et al., 2011) for avian coronaviruses (AvCoV), ii) that horizontal transmission was extremely rapid (within 10 hours), and (iii) that the viral genome was detected in intestinal contents up to five weeks post-inoculation. Such a long duration of excretion has also been documented for TCoVs in the United States. Further studies are under way to determine whether the detected virus genome in digestive excretions correlates with actual infectious virus.

INTRODUCTION

Les Coronavirus sont des virus enveloppés avec un génome constitué d'ARN positif simple brin, classés dans l'ordre des *Nidovirales* et dans la famille des *Coronaviridae*. Celle-ci est composée de quatre genres, alpha, beta, delta et gamma, définis sur la base des regroupements phylogénétiques. Le genre gamma-coronavirus est principalement composé de virus isolés chez les oiseaux (coronavirus aviaires notés AvCoV), avec parmi eux le virus de la bronchite infectieuse (IBV), le coronavirus de la dinde (TCoV) et le coronavirus de la pintade (GfCoV).

L'IBV est un virus hautement contagieux et transmis très rapidement parmi les oiseaux naïfs sur le terrain. Il est responsable dans le monde entier de maladies respiratoires, de chutes de ponte avec une mauvaise qualité des coquilles d'œuf, d'une réduction de l'éclosabilité, de néphrite et parfois, lors de l'infection précoce des futures reproducteurs, d'atrophies génitales responsables du syndrome des « fausses pondeuses » chez l'espèce poule.

Le TCoV, initialement répertorié comme l'un des agents responsables d'une entérite aiguë appelée bluecomb dans les années 70, a maintenant aussi été associé à une maladie multifactorielle dénommée « complexe entéritique du dindonneau » (PEC), qui regroupe plusieurs troubles intestinaux survenant chez la dinde avant sept semaines d'âge, et est répandue dans la plupart des élevages. Les signes cliniques comprennent souvent de la diarrhée, un retard de croissance, une anorexie, une déshydratation, une perte de poids et un dysfonctionnement immunitaire (atrophies du thymus et de la bourse de Fabricius) qui favorise des infections secondaires. La large distribution de ces virus et leur caractère hautement contagieux ont des répercussions économiques considérables.

Le caractère plus ou moins contagieux d'une maladie peut être mesuré par le « taux de reproduction » (R_0) défini comme « le nombre attendu de cas secondaires produits par une seule infection (typique) dans une population totalement susceptible ». Les paramètres nécessaires pour calculer le R_0 sont i) la vitesse de la transmission et ii) la durée d'excrétion des virus infectieux. En règle générale, un virus avec un R_0 inférieur à 1 disparaîtra rapidement car un individu infecté aura une faible capacité à en infecter un autre. En revanche, un virus dont le R_0 est supérieur à 1 se propagera dans la population sensible. Pour l'IBV, un R_0 de 20 a été estimé (de Wit et al., 1998), ce qui est comparable aux R_0 de virus humains hautement contagieux tels que le virus de la rougeole (12-18) (Knipe and Howley, 2013). Pour le TCoV, le R_0 n'a pas encore été évalué à ce jour, en revanche, une étude aux Etats-Unis a pu démontrer qu'une souche virale nord-américaine était détectable jusque 5 semaines post-infection (Breslin et al., 2000). Une longue durée d'excrétion a également été observée

avec le coronavirus entérique félin (FECV), dont le virus peut être excrété jusqu'à un an après infection, ou indéfiniment chez certains sujets (Kipar and Meli, 2014).

Cette étude porte sur la souche TCoV-080385d qui a été détectée en France en 2008, chez des dindes présentant des signes cliniques compatibles avec le PEC. Ce TCoV français (Fr-TCoV) est le seul TCoV européen isolé à ce jour, bien que d'autres souches aient été détectées en Pologne, en Grande-Bretagne et en Italie (Cavanagh et al., 2001; Domańska-Blicharz et al., 2010; Martin et al., 2002). Récemment, la séquence de son génome entier a révélé que les coronavirus de la dinde en Europe et aux Etats-Unis ont suivi des voies d'évolution différentes, chacune comportant des événements de recombinaison avec des souches d'IBV spécifiques à leur continent respectif (Brown et al., 2016).

L'étude présentée ici vise à déterminer les propriétés de transmission du TCoV-080385d en évaluant en premier lieu sa dose minimale infectieuse puis sa vitesse de reproduction (R_0) en conditions expérimentales chez le dindonneau EOPS, pour mieux connaître les possibilités de diffusion de la maladie, et la durée pendant laquelle un lot infecté reste contaminant.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Détermination de la dose minimale infectieuse

Cette expérimentation a été effectuée dans cinq isolateurs notés 1 à 5. Dans chaque isolateur, six dindonneaux EOPS, âgés de 10 jours et de poids homogène, ont été mis en place avec une mangeoire, un abreuvoir et une grille au sol recouverte de carton. A J0, les 6 dindonneaux en isolateur 1, 2, 3 ou 4 ont chacun été inoculés par voie orale, avec 0,25ml d'une dilution à $10^{-1.5}$, 10^{-3} , $10^{-4.5}$ ou 10^{-6} d'une suspension virale de la souche TCoV 080385d titrant à $10^{4.01}$ DIE₅₀/ml. Les 6 dindonneaux en isolateur 5 ont été inoculés par voie orale avec un placebo (même milieu que les dilutions).

A J1 post inoculation (PI), 2 nouveaux dindonneaux EOPS ont été introduits dans chacun des isolateurs 1 à 4, en tant que contacts. Ces animaux ont servi d'indicateurs de transmission horizontale. De J0 à J14 PI, des écouvillonnages cloacaux ont été réalisés quotidiennement sur tous les animaux dans chaque isolateur. Ces prélèvements ont été utilisés pour quantifier la charge virale à l'aide d'une qRT-PCR en temps réel dépistant tous les coronavirus aviaires (AvCoV-qRT-PCR) (Maurel et al., 2011). La limite de détection pour cette qRT-PCR et la zone de linéarité ont respectivement été décrites à 1^{E+02} copies/μl et entre 1^{E+03} à 1^{E+09} copies/μl.

Par conséquent, les échantillons ont été considérés comme positifs avec un nombre de copies par réaction supérieur à 1^{E+02} .

1.2. Vitesse de reproduction (R0)

Cette expérimentation a été effectuée dans deux animaleries, notées 1 et 2. L'animalerie 1 contenait un parc de 4,3 m² avec un sol litière de copeaux capable d'accueillir 30 dindonneaux de 10 jours jusqu'à 45 jours d'âge, avec une alimentation et un abreuvement à volonté. Cette densité de 7 sujets par m² respecte celle rencontrée en élevage. L'animalerie 2 a été préparée afin d'accueillir 3 dindonneaux pendant 72 heures.

A un jour d'âge, 29 dindonneaux ont été mis en place au sol dans l'animalerie 1, et 3 dans l'animalerie 2. A 10 jours d'âge, soit J0, des écouvillonnages cloacaux ont été réalisés sur tous les sujets dans les animaleries 1 et 2 pour confirmer leur statut négatif vis-à-vis du génome du TCoV en utilisant l'AvCoV-qRT-PCR. Le même jour, les 3 dindonneaux de l'animalerie 2 ont chacun été inoculés par voie orale avec 0,25 ml de la souche TCoV-080385d ($10^{4.01}$ DIE₅₀/ml) diluée à $10^{-4.5}$. A J1 PI, des écouvillonnages cloacaux ont été réalisés sur les 3 dindonneaux inoculés pour confirmer leur statut positif vis-à-vis du TCoV en utilisant l'AvCoV-qRT-PCR. A J2 PI, l'un des 3 sujets inoculés a été transféré vers l'animalerie 1 pour une mise en contact avec les 29 dindonneaux EOPS. Suite au transfert, des écouvillonnages cloacaux sur tous les sujets ont été réalisés toutes les 2 heures post-contact (PC) jusque 14h PC, puis à 26h, J2, J3 et J6 PC, et enfin de manière hebdomadaire jusqu'à J41 PC. Tous les prélèvements ont été utilisés pour quantifier la charge virale par l'AvCoV-qRT-PCR. Les échantillons ont été considérés comme positifs avec un nombre de copies par réaction supérieur à 1^{E+02} .

2. RESULTATS ET DISCUSSION

L'expérimentation *in vivo* effectuée pour déterminer la dose minimale infectieuse du Fr-TCoV sur dindonneaux EOPS a montré une infection chez l'ensemble des sujets inoculés par TCoV-080385d aux dilutions $10^{-1.5}$ et 10^{-3} , et 50 % à la dilution $10^{-4.5}$ à J1 PI. A J2 PI, une transmission horizontale a été observée chez les sujets en contact avec les sujets inoculés aux dilutions $10^{-1.5}$, 10^{-3} et $10^{-4.5}$. A la dilution 10^{-6} et avec le placebo (dindonneaux témoins), l'ensemble des sujets (inoculés et contacts) sont restés négatifs pendant toute la durée de l'expérimentation (Tableau 1). Le titre viral calculé sur la base de ces résultats à l'aide de la méthode de Reed et Muench (Reed and Muench, 1938) est de $10^{5.12}$ DID₅₀/ml, ce qui tend à prouver que les dindonneaux sont 10 fois plus sensibles que les œufs de dinde embryonnés. Ces résultats montrent également que la dose minimale infectieuse est très faible, à un tel point qu'elle ne peut pas être détectée avec l'AvCoV-qRT-PCR. Une si faible dose minimale infectieuse a déjà été décrite pour le virus de la diarrhée épidémique porcine (PEDV) (Goyal,

2014). Dans cette étude, une diarrhée a toujours été observée chez des porcelets inoculés avec une souche de PEDV diluée à 10^{-8} , une dilution elle aussi au-delà de la limite de détection par qRT-PCR.

L'étude effectuée pour déterminer la vitesse de reproduction a montré que le sujet inoculé et transféré vers l'animalerie 1 parmi les 29 dindonneaux contacts est passé du statut d'indétectable de l'ARN viral extrait à $1,9^{E+05}$ copies/μl en 24 heures. Ce sujet est resté positif jusqu'à J29 PI. Une transmission horizontale extrêmement rapide a été observée sur les sujets contacts : 2 dès 10 heures post-contact, puis 6 à 14 heures, 24 à 26 heures et enfin l'ensemble des sujets à 48 heures (Fig 1). 21 sujets sont restés toujours positifs à 6 semaines PC. A 48h le moyen valeur été à $1,4^{E+06}$ copies/μl (min-max 3.6^{E+04} - 1.0^{E+07} copies /μl) et à 6 semaine PC le moyen valeur été à $1,2^{E+03}$ copies/μl (min-max 1.0^{E+02} - 1.3^{E+04} copies/μl). La détection par RT-PCR de l'ARN spécifique du virus inoculé chez un sujet est clairement un bon révélateur d'infection et nous indique également que la réplication virale est active lorsqu'une augmentation de plusieurs log₁₀ en nombre de copies d'ARN est observée. Cependant, ces tests ne nous indiquent pas si la matrice amplifiée dans la RT-PCR provient d'une particule virale infectieuse ou d'un fragment d'ARN viral non infectieux libéré soit dans la cellule infectée, soit dans des débris cellulaires. Ainsi, le statut contagieux ou non d'un individu dont le nombre de copies d'ARN reste positif, mais à un niveau stable sur plusieurs semaines, ne peut être précisé sans utiliser des méthodes virologiques complémentaires. En effet, une étude de transmission du virus de la diarrhée épidémique porcine révèle qu'une détection de l'ARN viral jusqu'à J42 PI est toujours possible alors que le virus infectieux n'a été quant à lui excrété que jusqu'à J14 ou J16 PI (Crawford et al., 2015). En ce qui concerne l'étude présentée ici, les échantillons positifs par qRT-PCR à 6 semaines PC doivent donc maintenant être inoculés aux dindonneaux EOPS afin d'évaluer leur statut «infectieux/non infectieux» pour que le R0 puisse être calculé. Cela dit, étant donné que la dose infectieuse pour ce virus était indétectable par qRT-PCR, on pourrait s'attendre à ce que la majorité des oiseaux restent infectieux à 6 semaines PI, comme cela a été décrit précédemment pour les TCoV américains (Breslin et al., 2000). Si tel est le cas, le R0 devrait alors être supérieur à 20.

CONCLUSION

Ces deux études basées sur la cinétique de transmission d'un TCoV européen isolé en France en 2008 ont montré qu'une dose extrêmement faible de virus est nécessaire pour infecter des dindonneaux EOPS de 10 jours en conditions expérimentales, et que le virus est transmis extrêmement rapidement aux sujets sensibles qui sont en contact avec un sujet infectieux. On s'attend à ce que la durée d'excrétion des particules virales infectieuses s'étende au moins

jusqu'à 6 semaines PI, mais ce paramètre doit être évalué en effectuant une nouvelle expérimentation animale en infectant des sujets à partir des écouvillonnages cloacaux correspondants. Si les résultats obtenus sont corrélés au fait que les prélèvements à 6 semaines PC sont effectivement infectieux, alors le R0 risque d'atteindre au moins

celui des IBV (20). Même sans un R0 défini, l'ensemble de ces données font de cette souche un virus hautement contagieux et souligne l'importance des bonnes pratiques sanitaires à l'entrée des bâtiments d'élevage et la nécessité de considérer que les individus infectés peuvent encore être infectieux longtemps après l'épisode clinique.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Breslin, J.J., Smith, L.G., Barnes, H.J. and Guy, J.S., 2000. Avian Dis 44, 624-31.
- Brown, P.A., Touzain, F., Briand, F.X., Gouilh, A.M., Courtillon, C., Allee, C., Lemaitre, E., De Boisseson, C., Blanchard, Y. and Eterradossi, N., 2016. J Gen Virol 97, 110-20.
- Cavanagh, D., Mawditt, K., Sharma, M., Drury, S.E., Ainsworth, H.L., Britton, P. and Gough, R.E., 2001. Avian Pathol 30, 355-68.
- Crawford, K., Lager, K., Miller, L., Opriessnig, T., Gerber, P. and Hesse, R., 2015. Veterinary research 46, 49.
- de Wit, J.J., de Jong, M.C., Pijpers, A. and Verheijden, J.H., 1998. Avian Pathol 27, 464-71.
- Domańska-Blicharz, K., Seroła, A., Lisowska, A., Tomczyk, G. and Minta, Z., 2010. Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy 54, 473-477.
- Goyal, S., 2014. Environmental stability of PED (porcine epidemic diarrhea virus) University of Minnesota.
- Kipar, A. and Meli, M.L., 2014. Veterinary pathology 51, 505-26.
- Knipe, D.M. and Howley, P.M., 2013. Fields Virology, 6 ed. Lippincott Williams & Wilkins.
- Martin, A.M., Vinco, L.J., Cordioli, P. and Lavazza, A., 2002. 4th International Symposium on Turkey Diseases, 114-119.
- Maurel, S., Toquin, D., Briand, F.X., Queguiner, M., Allee, C., Bertin, J., Ravillion, L., Retaux, C., Turblin, V., Morvan, H. and Eterradossi, N., 2011. Avian Pathology 40, 179-89.
- Reed, L.J. and Muench, H., 1938. A simple method of estimating fifty percent end points. American journal of hygiene 27, 493-497.

Tableau 1. Détection de l'ARN viral du TCoV-080385d chez les sujets inoculés (I) et en contact direct (C)

Nombre de dindonneaux positifs en q RT-PCR (Sur 6 I et sur 2 C)									
Dilution	10 ^{-1.5}		10 ⁻³		10 ^{-4.5}		10 ⁻⁶		Témoin nég
I: Inoculé C: Contact	I	C	I	C	I	C	I	C	I
JPI	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1	6	0	6	0	3	0	0	0
	2	6	2	6	2	6	0	0	0
	3	6	2	6	2	6	0	0	0

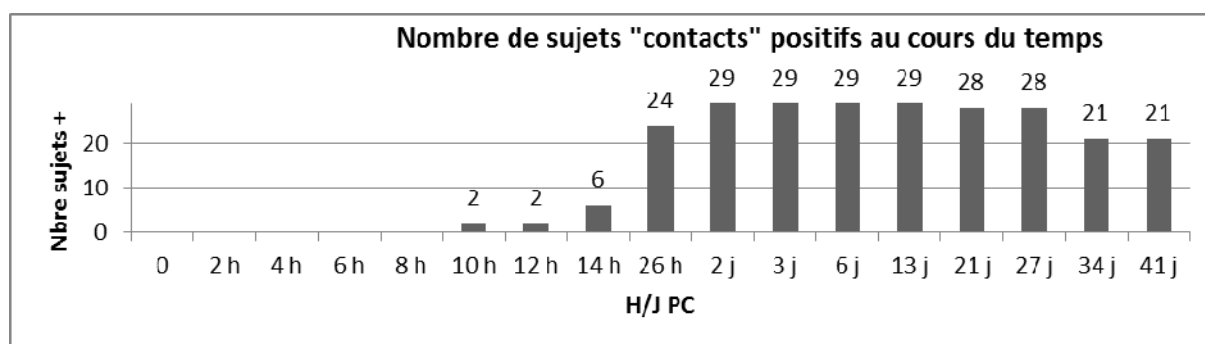


Figure 1. Détection de l'ARN viral du TCoV-080385d en qRT-PCR chez les sujets contact. Nombre des contacts positif sur 29 au cours du temps