

**LA PROVENTRICULITE A BIRNAVIRUS DU POULET DE CHAIR
EN FRANCE: UNE ETUDE RETROSPECTIVE HISTOPATHOLOGIQUE
ET MOLECULAIRE A PARTIR DE TISSUS INCLUS EN PARAFFINE.**

**Delpont Mattias¹, Delverdier Maxence¹, Lucas Marie-Noelle¹,
Albaric Olivier², Plassiart Georges³, Guy James S.⁴ et Guérin Jean-Luc¹**

¹*Université de Toulouse INP ENVT et INRA UMR 1225, 23 chemin des Capelles
31076 TOULOUSE,*

²*Oniris, 102 route de Gachet 44300 NANTES,*

³*Laboratoire d'histopathologie, avenue Leclerc de Hautesclocque 57000 METZ,*

⁴*CVM NCSU, William Moore Drive RALEIGH NC USA*

m.delpont@envt.fr & jl.guerin@envt.fr

RESUME

La proventriculite transmissible virale du poulet est une maladie qui touche le poulet en croissance. Elle est décrite de manière sporadique aux Etats-Unis et provoque des baisses de performance, sans augmentation significative de la mortalité. A l'autopsie, on observe une hypertrophie marquée et une pâleur de la muqueuse du proventricule. A l'histopathologie, des lésions inflammatoires aiguës des glandes sous-muqueuses sont systématiquement observées. Un birnavirus aviaire, dénommé *Chicken Proventricular Necrosis Virus* (CPNV), différent de l'agent de la maladie de Gumboro, a été récemment détecté dans des cas de proventriculite et proposé comme agent majeur de cette maladie. La proventriculite à CPNV été suspectée en Europe mais n'a été formellement identifiée pour la première fois qu'en 2011 en France. Quatre-vingt-trois cas suspects de proventriculite virale (soit 130 échantillons) datés de 1998 à 2013 ont été sélectionnés à partir des bases de données de deux laboratoires français d'histopathologie aviaire, sur la base d'observation de lésions histopathologiques caractéristiques sur le proventricule. Une extraction des acides nucléiques a été réalisée à partir des blocs de paraffine, selon un protocole modifié. Une RT-PCR spécifique du CPNV a ensuite été réalisée et a permis de détecter l'acide nucléique du CPNV dans 25/130 échantillons, correspondant à 14 cas cliniques décrits entre 1998 et 2013. Cette étude rétrospective sur la proventriculite virale donne un aperçu épidémiologique de la maladie en France. Elle suggère que le virus y est présent depuis au moins une quinzaine d'années. Des études supplémentaires permettront de mieux connaître son incidence et son impact pathologique réel et son mode de transmission dans les élevages de poulets de chair français.

ABSTRACT

Birnavirus-associated Proventriculitis in French broiler chickens: a retrospective histopathological and virological study on archival tissues

Chicken proventriculitis is a viral disease caused by a birnavirus, namely Chicken Proventriculitis Necrosis Virus (CPNV). This condition has been sporadically described in the USA and is characterised by severe runting with no significant increase of mortality. Gross pathology shows a marked thickening and whitening of the proventriculus mucosa. Histopathology shows acute inflammatory lesions of the submucosal glands. In Europe, the disease had been suspected, but it has been formally identified for the first time in 2011 in France. Putative CPNV-associated proventriculitis cases were recorded from the databases of two main French avian histopathology diagnostic laboratories, on the basis of observations of characteristic histopathological pictures on the proventriculus. More than 130 suspected cases were recorded from years 1998 to 2013. An extraction of nucleic acids was performed with a modified protocol from formalin-fixed paraffin-embedded tissues. A CPNV-specific RT-PCR assay was performed, as previously described. This study provides an epidemiological picture of viral proventriculitis in France and suggests that this virus is present in broilers for, at least, fifteen years. Further studies are required in order to specify how the virus is transmitted, its current prevalence in French broilers and how far it is involved in the pathological process.

INTRODUCTION

La proventriculite virale du poulet est une maladie qui touche le poulet de chair. Elle est décrite de manière sporadique aux Etats-Unis et provoque une dégradation des performances de croissance mais sans augmentation de mortalité (Kouwenhoven et al., 1978). A cela peuvent s'ajouter des retraits en abattoir car le proventricule est fragilisé et risque de se déchirer lors de l'éviscération. A l'autopsie, on observe une hypertrophie et une pâleur de la muqueuse. L'histopathologie révèle des lésions caractéristiques : nécrose de l'épithélium glandulaire, dégénérescence et hyperplasie de l'épithélium canalaire, et remplacement de l'épithélium glandulaire par de l'épithélium canalaire (Goodwin et al., 1996, Dormitorio et al., 2007). L'agent étiologique proposé comme agent de la maladie est un birnavirus dénommé CPNV (*Chicken Proventricular Necrosis Virus*). C'est un virus à ARN double brin bisegmenté différent de celui de la maladie de Gumboro (IBDV). Très peu d'informations moléculaires sont disponibles à ce jour sur ce virus. Le CPNV a été proposé en tant qu'agent probable de la maladie aux Etats-Unis en 2011 (Guy et al., 2011a). Depuis, le premier cas français de proventriculite associé au CPNV a été mis en évidence en 2011 (Marguerie et al., 2011).

La RT-PCR mise au point pour détecter le virus cible le gène de la protéine VP1, l'ARN-polymérase ARN-dépendante (RdRp). Cette PCR est spécifique du CPNV, la séquence de la protéine VP1 étant significativement différente de celle de l'IBDV (Guy et al., 2011a).

Cette étude avait pour but d'évaluer l'association du CPNV avec les cas cliniques de proventriculite virale du poulet et d'évaluer son incidence en France, en recherchant le CPNV dans des tissus inclus dans des blocs de paraffine, correspondant à des cas suspects français antérieurs à 2011.

MATERIEL ET METHODES

Recrutement des cas

Sur la base des observations de lésions histologiques caractéristiques sur le proventricule (nécrose et hyperplasie de l'épithélium canalaire, et remplacement de l'épithélium glandulaire par un épithélium canalaire), 83 cas suspects de proventriculite virale ont été sélectionnés (soit 130 blocs de paraffine). Ils provenaient de deux laboratoires français spécialisés en histologie aviaire (Laboratoire d'histopathologie animale d'ONIRIS, Nantes, et Laboratoire d'histopathologie vétérinaire de Metz). Les cas concernés sont datés de 1998 à 2013. Les commémoratifs des cas comprenaient leur localisation (par numéro de département), l'année, le type de production (standard, label), l'âge des

animaux et le principal motif de consultation quand il était enregistré (Tableau 1).

Traitement des blocs de paraffine

Sur les bases d'un protocole modifié (Ma et al., 2009), les tissus proventriculaires ont été préparés en vue d'une extraction d'acides nucléiques. Des sections de 100 à 300 µm d'épaisseur ont été réalisées dans les blocs de paraffine à l'aide d'une lame de scalpel. Les tissus disséqués dans la section de chaque bloc ont ensuite été traités avec 1 mL de Toluène à 100%, incubés à 55°C pendant 3 minutes puis centrifugés 1 minute à 12000 rpm. La même étape a été répétée, avec un temps d'incubation de 20 minutes et une centrifugation de 2 minutes. Les échantillons ont ensuite été lavés avec 1 mL d'éthanol à 100% puis séchés à l'air libre. Ce lavage a été répété une fois. Enfin, les tissus ont été mélangés à 150 µL d'une solution de digestion contenant de la protéinase K (500 µg/mL), du Tris-HCl (20 mM, pH=8), du CaCl₂ (1 mM) et du dodécylsulfate de sodium (SDS, 0,5%) et ont été mis en incubation à 55°C pendant 3 heures.

Extraction des acides ribonucléiques

Le protocole a consisté en une extraction des acides ribonucléiques (ARN) au phénol-chloroforme : les échantillons ont été mélangés à 1 mL de TRAzol © (incubation 5 minutes) puis mélangés avec 200 µL de chloroforme (10 minutes). Après centrifugation (12 000 rpm, 10 minutes) le surnageant a été mélangé avec 500 µL d'isopropanol. Après centrifugation (12000 rpm, 2 minutes) le culot a été lavé avec 1mL d'éthanol à 75°, séché à l'air libre et mis en solution avec 50 µL d'eau nanopure.

RT-PCR

La préparation des ADNc viraux a été réalisée dans un premier temps avec 0,7 µL d'hexanucléotides (10µM), 6,8 µL d'eau nanopure et 5 µL de la solution d'ARN puis chauffés à 95°C pendant 5 minutes. Après refroidissement, ont été ajoutés 4µL de Reaction Buffer RT (5X, Thermoscientific ©), 1 µL de RevertAid H minus Reverse transcriptase (200 U/µL, Thermoscientific ©), 0,5 µL de RNase Out TM Recombinant Ribonuclease Inhibitor (Life technologies ©) et 2 µL de dNTP. Ce mélange réactionnel a été chauffé 10 minutes à 25°C, puis 60 minutes à 42°C et 10 minutes à 70°C.

La PCR a été réalisée avec 1,25 µL d'amorces B2F et B2R (10 µM) (Guy et al., 2011a), 14,9 µL d'eau nanopure, 0,5 µL de dNTP (10 mM), 5 µL de Kapa 2G Buffer B (2X, Kapabiosystems ©), 0,1 µL de Kapa 2G Robust polymerase (Kapabiosystems ©) et 2 µL de solution d'ADNc viral. Les échantillons ont ensuite été placés dans un thermocycleur : 2 minutes à 95°C puis 35 cycles avec une dénaturation 30 secondes à 95°C, une hybridation 30 secondes à 50°C

et une élongation 30 secondes à 72°C. Enfin, les échantillons ont été incubés 2 minutes à 70°C.

La migration des produits de PCR a été réalisée sur gel d'agarose à 1,5%, avec un intercalant (Safeview ©) utilisé au 1/10 000^{ème}, un tampon de charge au bleu de bromophenol à 5X, 1 µL de solution d'ADN amplifié et 4 µL d'une échelle de « 100 pb » (GeneRuler™ 100 pb Plus DNA Ladder). La migration a été effectuée sous 75 mV.

Séquençage des produits de PCR

Cinq produits de PCR ont été sélectionnés et séquencés selon la méthode Sanger, après extraction du gel de migration selon le protocole du kit Neo Biotech®.

RESULTATS ET DISCUSSION

Le recrutement des cas cliniques est décrit dans le Tableau 1.

La PCR s'est avérée positive pour 25 échantillons sur 130, soit 14 cas sur 83. Le produit de PCR correspondait au fragment de 171 pb attendu. Par ailleurs, le séquençage de 3 produits de PCR sur 5 a permis de mettre en évidence 95 à 100% d'identité nucléotidique avec la séquence CPNV de référence (RNA-dependent RNA polymerase, GenBank accession nb HM038436).

Parmi les lots positifs, les animaux ont entre 3 et 7 semaines pour des poulets standards et 10 semaines pour un lot de poulet label. Les 14 occurrences s'étendent de 1998 à 2013 et couvrent des bassins majeurs de la production avicole française : Ain, Haute-Garonne, Ille-et-Vilaine, Landes, Loire-Atlantique, Pyrénées-Atlantiques mais aussi hors métropole à La Réunion (Figure 1).

Les résultats de PCR puis le séquençage, associés aux observations histopathologiques, permettent de confirmer la présence du virus dans certains cas suspects de proventriculite virale.

Le CPNV n'a néanmoins pas pu être détecté dans la majorité des suspicions. Plusieurs explications peuvent être avancées : (1) la procédure d'extraction des acides nucléiques à partir des blocs de paraffine représente une contrainte certaine, car elle ne permet pas une détection optimale des acides nucléiques. Des nombreux « faux négatifs » sont donc possibles du seul fait de la dégradation du matériel génétique dans

les blocs ; (2) il est connu que selon le stade de la maladie, les lésions peuvent persister alors que le CPNV n'est plus détectable par la procédure de PCR classique disponible (Guy et al., 2011b) ; (3) d'autres agents pathogènes pourraient être associés à des cas de proventriculite du poulet, le CPNV ne rendant compte que d'une part de ces cas (Grau-Roma et al., 2010). Ainsi, le virus de la bronchite infectieuse a été détecté dans certains cas de proventriculite, même si le CPNV n'a pas été testé dans cette étude (Ganapathy et al., 2102).

Ces différentes hypothèses mériteront des investigations complémentaires.

On peut donc penser que le CPNV était présent sur le territoire français depuis 1998 dans des cas sporadiques de proventriculite et ce, dans plusieurs bassins de production avicole.

L'identification d'un cas chez des poulets de 10 semaines confirme que les poulets standards de 4 à 7 semaines ne sont pas les seuls concernés par la proventriculite virale, comme cela était communément suggéré (Kouwenhoven et al., 1978, Guy et al., 2011b, Marguerie et al., 2011). En effet, on a pu mettre en évidence récemment le CPNV dans un contexte clinique chez des poulets reproducteurs et des poules pondeuses d'œufs de consommation de 9 à 20 semaines (Marusak et al., 2012).

Les informations sur la structure génétique du CPNV sont extrêmement limitées à ce jour, seules quelques centaines de nucléotides étant disponibles dans les banques de données de séquences publiques. Il est donc impossible à ce stade de réaliser des études phylogéniques pour évaluer la diversité génétique virale.

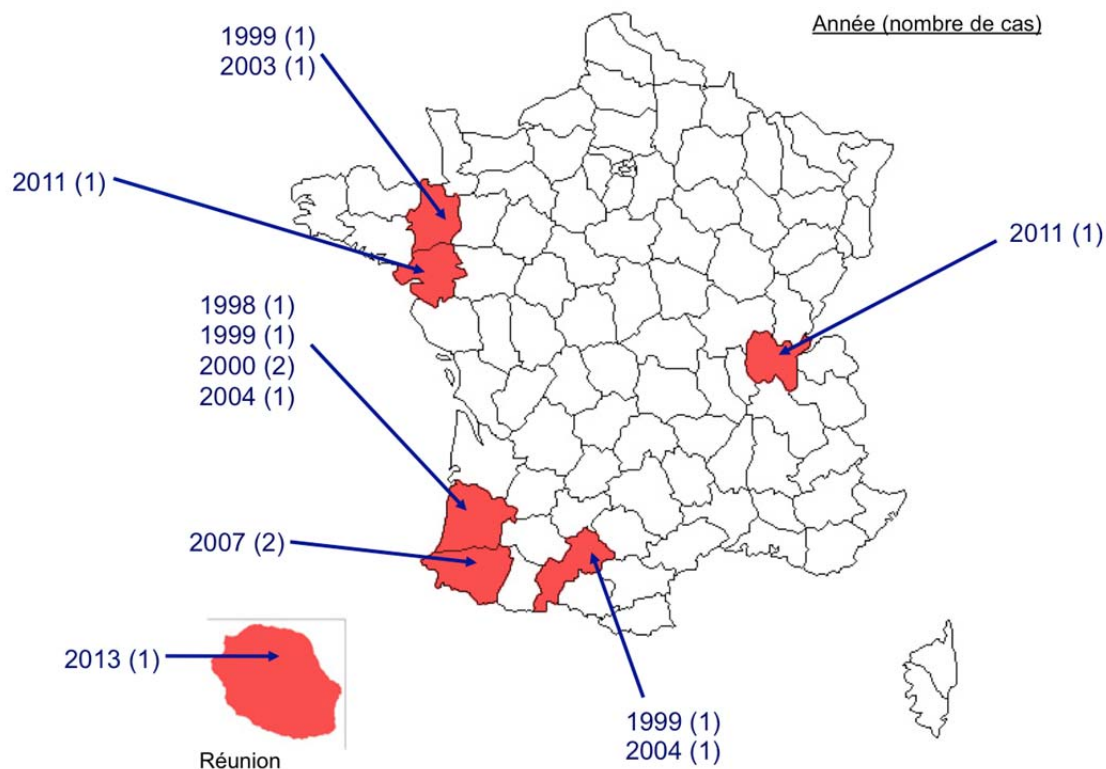
Perspectives

Afin de confirmer l'implication du CPNV dans les cas de proventriculite, une détection du virus par immunohistochimie sur coupe histologique sera réalisée dans les prochains mois. Par ailleurs, le développement des connaissances génétiques sur le CPNV permettra sans doute à l'avenir de mieux comprendre la dynamique évolutive de ces virus et ses relations génétiques avec le virus IBDV. Enfin, il reste à étudier, sur le terrain, la prévalence réelle et l'impact pathologique de ce virus dans la dégradation des performances chez le poulet de chair, afin d'évaluer l'opportunité de mettre en place des mesures de contrôle.

Tableau 1. Commémoratifs des cas positifs au CPNV

Année	Production	Age (semaines)	Origine (département)	Suspicion clinique initiale	Lésions microscopiques
1998	Standard	4	40	x	(1)
1999	Standard	3	31	x	(1)
1999	Standard	5	35	Réovirus + hépatite virale	(1)
1999	Standard	3	40	x	(1)
2000	Standard	4	40	x	x
2000	Standard	4	40	x	x
2003	Standard	x	35	x	x
2004	Standard	x	40	x	x
2004	Standard	7	31	x	(1)
2007	Label	10	64	Bursite infectieuse	(1)
2007	Standard	4	64	x	(1)
2011	Standard	7	44	x	(1)
2011	Standard	5	1	Maladie de Marek	(1)
2013	Standard	4	97	Baisses de performance	(1)

(1) Dégénérescence et hyperplasie de l'épithélium canalaire, et remplacement de l'épithélium glandulaire par de l'épithélium canalaire

Figure 1. Localisation et date des cas positifs à la détection de CPNV par PCR

En rouge : départements français où une suspicion de proventriculite virale a été associée à la présence du CPNV entre 1998 et 2013. Entre parenthèses le nombre de cas détectés la même année dans le département.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Dormitorio T V, Giambrone J J et Hoerr, F J, 2007. Avian Pathol, 36(2), 87-91.
2. Ganapathy K, Wilkins M, Forrester A, Lemiere S, Cserep T, McMullin P, Jones RC, 2012. Vet Rec, 171(23), 197
3. Goodwin M A, Hafner S, Bounous D I, Latimer K S, Player E C, Niagro F D, Campagnoli R P, et Brown J, 1996. Avian Pathol, 25(2), 369–379.
4. Grau-Roma L, Marco A, Martínez J, Chaves A, Dolz R, Majó N, 2010. Vet Rec, 167, 836.
5. Guy J S, West M A, et Fuller F J, 2011a. Avian Dis, 55 (1), 2–7.
6. Guy J S, West M A, Fuller F J, Marusak R A, Shivaprasad H L, Davis J L, et Fletcher O J, 2011b. Avian Dis, 55(1), 70–75.
7. Kouwenhoven F G, Davelaar et Van Walsum J, 1978. Avian Pathol, 7, 183-187.
8. Ma Z, Lui W-O, Fire A, et Dadras S S, 2009. J Mol Diag, 11, 5, 420–429.
9. Marguerie J, Leon O, Albaric O, Guy J S, et Guerin J-L, 2011. Vet Rec, 169, 15, 394–396.
10. Marusak R A, West M A, Davis J F, Fletcher O J, et Guy J S, 2012. Avian dis, 56, no. 4, 757–759.