

**RELATIONS PHYLOGENETIQUES ENTRE ISOLATS FRANÇAIS
DE PARVOVIRUS DE L'OIE ET DU CANARD DE BARBARIE :
ETUDE COMPARATIVE ENTRE SOUCHES SAUVAGES CIRCULANTES
ET SOUCHES VACCINALES UTILISEES POUR LEUR CONTROLE**

**Isabelle Devaud¹, Jean-Bernard Herin¹, Stéphane Lemièr², Jean-Luc Guerin³,
Jean-Luc Pingret⁴**

¹*MERIAL France – 106 Rue Charles et Gabriel Voisin –
44154 ANCENIS Cedex 4 – France ;*

²*MERIAL S.A.S. – 29 Avenue Tony Garnier – 69348 LYON Cedex 7 – France ;*

³*ENVIT – 23 Chemin des Capelles – 31076 TOULOUSE Cedex 3 – France ;*

⁴*SCANELIS – 9 Allée Charles Cros – 31771 COLOMIERS Cedex – France*

isabelle.devaud@merial.com

RESUME

Le canard de Barbarie est reconnu sensible aux parvovirus : parvovirus de l'oie ou Goose parvovirus (GPV), responsable de la maladie de Derzsy et parvovirus spécifique du canard de Barbarie (MDPV). Ces virus constituent une menace pour la filière. Des études de variabilité génétique de souches sauvages circulant en France en 2011 ont été effectuées par séquençage des gènes codant les protéines de capsides, respectivement VP1 pour le MDPV et VP2 pour le GPV. Le séquençage montre une grande stabilité génétique des souches sauvages de MDPV et une similarité nucléotidique de 100 % avec la souche de référence 89 384 du laboratoire de référence français (AFSSA, Ploufragan, France). Une étude plus récente, en 2014, permet de définir la très grande proximité du virus vaccinal GM199 utilisée pour la formulation du vaccin vivant MDPV récemment enregistré en Europe, Parvovuk[®], avec ces mêmes souches sauvages de 2011 et avec 5 isolats datant de fin 2013-début 2014. Onze marqueurs génétiques dans le gène VP1 permettent la différenciation de cette souche vaccinale avec les souches sauvages de parvovirus du canard. Ces études confirment la très grande stabilité génétique des parvovirus en ce qui concerne le génome codant pour les protéines de capside : le vaccin vivant MDPV GM199 semble donc adapté à la problématique de terrain actuelle.

ABSTRACT

Phylogenetic relationship between goose parvovirus and Muscovy duck parvovirus French isolates: a comparative study of wild-type Goose and Muscovy duck parvoviruses and vaccine strains.

Muscovy duck is recognized to be susceptible to the parvoviruses: Goose Parvovirus (GPV) at the origin of Derzsy's disease and a specific to the Muscovy Duck species parvovirus (MDPV). These viruses represent a threat to the duck production organizations. Genetic variability studies of 2011 wild circulating strains of France were performed using respectively viral protein 1 VP1 gene sequencing for the MDPV and viral protein 2 VP2 gene sequencing for the GPV. Sequencing results show a remarkable genetic stability of the wild strains of MDPV and a nucleotidic 100% similarity with the reference strain 89 384 of the French reference laboratory (AFSSA, Ploufragan, France). A more recent study from 2014 enables to determine the very close relationship between the vaccine strain GM199 used for the formulation of a recently registered live MDPV vaccine in Europe, Parvovuk[®], and the eleven wild virus isolates of 2011, as well as 5 recent isolates from end of 2013-beginning of 2014. Eleven genetic markers in the VP1 gene enable to differentiate the strain of this vaccine from the wild parvovirus strains of ducks. These studies will confirm the remarkable genetic stability of the parvoviruses, especially for the viral protein coding region of the genome: therefore the live MDPV vaccine GM199 strain seems to be suitable to the current problems to solve in field conditions.

INTRODUCTION

Le canard de Barbarie est reconnu sensible aux parvovirus : le parvovirus de l'oie ou *Goose parvovirus* (GPV), responsable de la maladie de Derzsy et le parvovirus spécifique du canard de Barbarie (MDPV). Ces virus constituent une menace pour la filière (JESTIN et al., 1991). Des études de stabilité génétique de souches sauvages circulant en France ont été effectuées par séquençage des gènes codant les protéines de capsides virales, respectivement protéine virale 1 (*viral protein VP1*) VP1 pour le MDPV et protéine virale 2 (*viral protein VP2*) VP2 pour le GPV. Les ADN extraits au moment du diagnostic ont été amplifiés par PCR, séquencés et analysés. Une comparaison avec les souches vaccinales a été conduite : isolat Derzsy avec la souche Hoekstra, incluse dans le vaccin vivant de la maladie de Derzsy, Palmivax® (Merial S.A.S., Lyon, France) et isolats MDPV avec la souche GM199, incluse dans le vaccin vivant atténué de la parvovirose du canard de Barbarie, Parvovuk® (Merial S.A.S., Lyon, France) (MAURIN-BERNAUD et al., 2013).

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Caractérisation d'isolats du virus de la maladie de Derzsy

Nous avons amplifié par PCR, séquencé et analysé le gène VP2 de 5 isolats de virus de la maladie de Derzsy. Les cas de maladie de Derzsy étant essentiellement confirmés sur canards mulards en France, ces prélèvements proviennent de différents élevages atteints de maladie de Derzsy dans le Sud-Ouest de la France et collectés entre 2008 et 2010. Les ADN extraits au moment du diagnostic PCR ont été conservés à -20°C et ont servi à l'étude de typage moléculaire. Afin de séquencer le gène VP2, trois PCR chevauchantes ont été dessinées par le laboratoire d'analyses moléculaires (Scanelis, Colomiers, France). Pour chaque échantillon, les trois produits de la PCR ont été séquencés dans les deux sens (sur les deux brins de l'acide nucléique) afin d'obtenir une fiabilité maximale. La construction d'une séquence nucléique consensus pour chaque échantillon a permis de déduire la séquence du gène codant pour la VP2.

1.2. Caractérisation d'isolats du virus de la parvovirose du canard de Barbarie

Nous avons amplifié par PCR, séquencé et analysé le gène VP1 de 14 isolats du parvovirus du canard de Barbarie. Ces prélèvements proviennent de différents élevages de canards de Barbarie atteints de parvovirose, collectés en France entre 2005 et 2014. Les ADN extraits au moment du diagnostic PCR ont été conservés à -20°C et ont servi à l'étude moléculaire. Afin de séquencer le gène VP1, quatre

PCR chevauchantes ont été dessinées par Scanelis. Pour chaque échantillon, chacun des produits de PCR a été séquencé en double brin afin d'obtenir une fiabilité maximale. La construction d'une séquence nucléique consensus pour chaque échantillon a permis de déduire la séquence du gène VP1.

Le choix des isolats a été fait conjointement par Merial et Scanelis de manière à constituer 4 groupes (Tableau 1) : 1 groupe de référence incluant des cas historiques (collection Scanelis), 2 groupes constitués tous les deux d'isolats de 2011 pour lesquels la clinique a été observée à des âges différents ; 1 groupe d'isolats récents (fin 2013-début 2014) à partir de 4 cas cliniques d'âges variant de 3 semaines à 9 semaines et d'une souche isolée d'écouvillons prélevés dans l'environnement (cas sélectionnés par Merial). Chaque isolat a été caractérisé et comparé à la souche vaccinale GM199.

La souche française de référence (89 384) a également été incluse dans l'étude (LE GALL-RECULE et al., 1994).

2. RESULTATS ET DISCUSSION

Analyse des séquences des isolats de virus Derzsy

Les séquences obtenues pour les 5 isolats du virus de la maladie de Derzsy et la souche vaccinale Hoekstra montrent une grande conservation de la séquence ADN du gène VP2. Douze polymorphismes ont été mis en évidence sur les 1764 paires de base (pb) du gène ce qui correspond à un minimum de 99.3% d'identité selon les isolats. Quatre mutations étant silencieuses, la séquence protéique déduite montre seulement huit polymorphismes. Les 5 isolats présentent des séquences différentes et chaque isolat présente 2 à 3 polymorphismes par rapport aux autres isolats.

Analyse des séquences des isolats de parvovirus du canard de barbarie

Les séquences obtenues à partir des échantillons de terrain collectés ont été analysées afin d'identifier les polymorphismes nucléotidiques (SNP – Single Nucleotide Polymorphism), les résultats sont présentés dans le tableau 2.

Une grande proximité génétique est observée pour l'ensemble des échantillons et en particulier pour 13 des 14 isolats de parvovirus du canard de Barbarie qui montrent une remarquable conservation de la séquence génétique de la VP1 ce qui est un résultat attendu compte tenu de la stabilité génétique des parvovirus. Huit isolats de 2011 à 2014 sont parfaitement identiques à la séquence de la souche de référence (89 384 isolée en France en 1989). Cinq autres isolats de 2013 et 2014 possèdent entre 1 et 4 SNP sur les 2 199 paires de bases du gène de la VP1 (taux de substitution inférieur à 0.2%).

Un des échantillons P13120178-1 présente un nombre élevé de SNP regroupés dans une zone du gène très restreinte (1310-1410). De plus, cette zone de

100 nucléotides regroupant 15 SNP est quasiment identique à la séquence correspondante du gène VP1 du virus de la maladie Derzsy ce qui laisse supposer que cet isolat pourrait être le résultat d'une recombinaison entre les 2 virus. Ce phénomène a été précisément décrit récemment (ZHU et al., 2014).

Afin de positionner ces isolats de terrain par rapport à la souche GM199, la séquence de cette souche vaccinale a été comparée aux séquences de l'étude. L'ensemble des isolats présente entre 16 et 18 SNP et la souche P13120178-1 (recombinant MDPV/Derzsy) présente 31 SNP. Ce résultat correspond à ce qu'on peut attendre d'une souche vaccinale atténuée présentant donc des caractéristiques propres.

Onze marqueurs génétiques (nucléotides) dans le gène VP1 permettent la différenciation de la souche vaccinale GM199 des souches sauvages de parvovirus du canard et de l'oie (EMEA, 2014).

Analyse phylogénétique des isolats de parvovirus du Barbarie

Un arbre phylogénétique a été réalisé afin de comparer graphiquement les séquences obtenues (Figure 1). Les séquences de souches isolées en Chine et en Hongrie (N° accession GenBank respectifs AY510603 et X75093) ont également été ajoutées afin de compléter cette analyse. Les distances génétiques ont été estimées par la méthode « Juke & Cantor » et l'arbre phylogénétique a été construit grâce à la méthode « Neighbor-joining ».

Cet arbre illustre la très grande proximité des 14 souches sauvages étudiées et de la souche vaccinale GM199 avec la souche française de référence 89384.

CONCLUSION

Les analyses moléculaires des gènes codant les protéines de capsides VP2 pour le virus de la maladie de Derzsy et VP1 pour le Parvovirus du canard de Barbarie mettent en évidence un très faible nombre de polymorphismes des souches sauvages. Cette remarquable conservation est en accord avec la très grande stabilité génétique des parvovirus habituellement admise (CHANG et al., 2000 ; LE GALL-RECUÉ et al., 1994).

Les gènes VP1 ou VP2 codent pour les protéines de la capside des parvovirus qui sont impliquées dans les processus immunitaires des hôtes contre les parvovirus. Il est important de souligner que cette étude indique la proximité des gènes VP1 et VP2 des virus sauvages d'avec ceux des virus vaccinaux Hoekstra et GM199 inclus ici.

Au vu de ces résultats, l'hypothèse de mutations sur la VP1 ou VP2 pouvant expliquer de nouvelles expressions cliniques est à écarter. Un seul des isolats P13120178-1 illustre une mutation possible entre le virus de la maladie de Derzsy et le parvovirus du canard de Barbarie ; une recombinaison entre ces 2 virus a déjà été rapportée en Chine (ZHU et al., 2014). Elle pourrait être favorisée par la co-infection virus Derzsy et parvovirus du canard de Barbarie détectée dans quelques cas rares chez le canard de Barbarie. Une étude complémentaire de séquençage afin d'obtenir la séquence des génomes complets de ces isolats permettrait de clarifier définitivement la situation.

Le vaccin vivant MDPV contenant la souche GM199, parvovirus vivant atténué du canard de Barbarie, induit une immunité active et spécifique contre la parvovirose du canard de Barbarie et la maladie de Derzsy chez les oiseaux vaccinés (MAURIN-BERNAUD et al., 2013). Ce vaccin est donc adapté à la problématique terrain actuelle.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. JESTIN, V., LE BRAS, M.O., CHERBONNEL, M., LE GALL, G. & BENNEJEAN, G. (1991) Recueil de Médecine Vétérinaire 167, 849-857
2. CHANG, P.-C., SHIEN, J.-H., WANG, M.-S. & SHIEH, H.-K, Avian pathology (2000), 29, 45-49
3. EMEA/V/C/002740, 11/04/2014 -Parvovirus, Product information, Summary of products characteristics
4. LE GALL-RECUÉ, G. & JESTIN, V. (1994) Archives of Virology 139(1-2), 121-131
5. MAURIN-BERNAUD, L., MERDY, O., LE-GROS, F.X. & GOUTEBROZE, S. (2013) Actes des 10èmes Journées de la recherche avicole et palmipèdes à foie gras du 26-28 mars 2013, La Rochelle, France, pp. 284-288
6. ZHU, Y.-M., ZHOU, Z.-G., HUANG, Y.-U. (2014), Veterinary Microbiology, China, 10.032

Tableau 1. Isolats de parvovirus du canard de barbarie

Groupe d'isolats	Id. Scanelis	Date de collecte
Groupe 1 Cas historiques (souches références) - Age des sujets inconnu	508-169	Mai 2005
	508-430	Août 2005
	607-720A	Juin 2007
Groupe 2 Isolats collectés sur des sujets âgés de 3-4 semaines	P11050416-1	Mai 2001
	P11040932-1	Avril 2011
	P11040935-1	Avril 2011
Groupe 3 Isolats collectés sur des sujets âgés de 7-8 semaines	P11040240-1	Avril 2011
	P11030975-1	Mars 2011
	P11030973-1	Mars 2011
Groupe 4 Isolats collectés sur sujets âge variant de 3 semaines* à 9 semaines** Isolats collectés dans l'environnement***	P13120178-1**	Décembre 2013
	P13120738-1*	Décembre 2013
	P14040598-1	Avril 2014
	P14040632-1	Avril 2014
	P131209607-9***	Décembre 2013

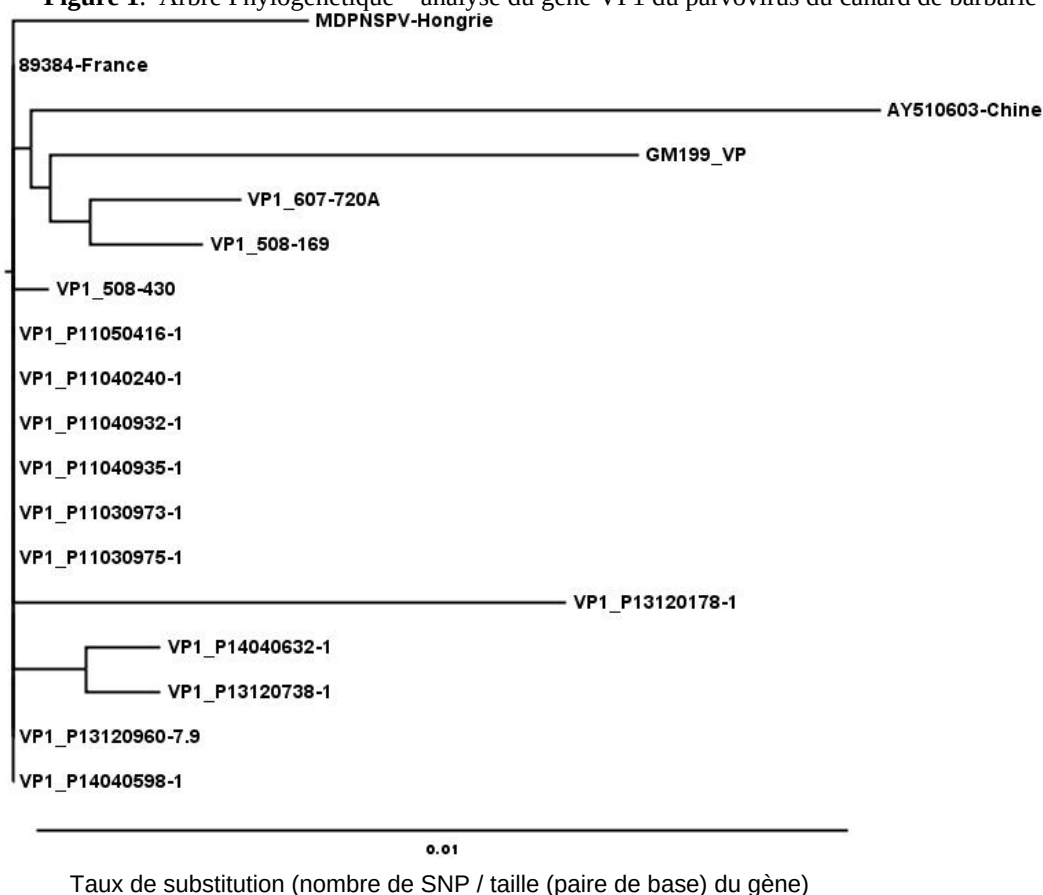
Figure 1. Arbre Phylogénétique – analyse du gène VP1 du parvovirus du canard de barbarie

Tableau 2. Analyse des polymorphismes (SNP) observés entre les différents isolats

Nombre de polymorphismes	89384-Fance	508-169	508-430	607-720A	P11040932-1	P11040935-1	P11050416-1	P11040240-1	P11030973-1	P11030975-1	P13120178-1	P13120738-1	P13120960 7-9	P14040598-1	P14040632-1	GM199
89384-Fance	0	3	1	4	0	0	0	0	0	0	15	2	0	0	2	16
508-169		0	4	3	3	3	3	3	3	3	18	5	3	3	5	17
508-430			0	5	1	1	1	1	1	1	16	3	1	1	3	17
607-720A				0	4	4	4	4	4	4	19	6	4	4	6	18
P11040932-1					0	0	0	0	0	0	15	2	0	0	2	16
P11040935-1						0	0	0	0	0	15	2	0	0	2	16
P11050416-1							0	0	0	0	15	2	0	0	2	16
P11040240-1								0	0	0	15	2	0	0	2	16
P11030973-1									0	0	15	2	0	0	2	16
P11030975-1										0	15	2	0	0	2	16
P13120178-1											0	17	15	15	17	31
P13120738-1												0	2	2	0	18
P13120960 7-9													0	0	2	16
P14040598-1														0	2	16
P14040632-1															0	18
GM199																0

Relations phylogénétiques entre isolats français de parvovirus de l'oie et du canard de barbarie : étude comparative entre souches sauvages circulantes et souches vaccinales utilisées pour leur contrôle



Isabelle Devaud¹, Jean-Bernard Herin¹, Stéphane Lemièr², Jean-Luc Guerin³, Jean-Luc Pingret⁴

¹Meriel France, 106 rue Charles et Gabriel Voisin, 44154 Ancenis cedex 4 - France ; ²Meriel S.A.S., 29 avenue Tony Garnier 69348 Lyon cedex 7 - France ; ³ENVT - 23 Chemin des Capelles - 31076 TOULOUSE Cedex 3 - France ; ⁴SCANELIS - 9 Allée Charles Cros - 31771 COLOMIERS Cedex - France

INTRODUCTION

Le canard de Barbarie est sensible aux parvovirus : le parvovirus de l'oie (GPV), responsable de la maladie de Derzsy et le parvovirus spécifique du canard de Barbarie (MDPV) (1). Des études de stabilité génétique de souches sauvages circulant en France ont été effectuées par séquençage des gènes codant les protéines de capsides virales, respectivement protéine virale 1 (viral protein VP1) VP1 pour le MDPV et protéine virale 2 (viral protein VP2) VP2 pour le GPV. Les ADN extraits au moment du diagnostic ont été amplifiés par PCR, séquencés et analysés. Une comparaison avec les souches vaccinales a été conduite : isolat Derzsy avec la souche Hoekstra, incluse dans le vaccin vivant de la maladie de Derzsy, Palmivax® (Meriel S.A.S., Lyon, France) et isolats MDPV avec la souche GM199, incluse dans le vaccin vivant atténué de la parvovirose du canard de Barbarie, Parvovuk® (Meriel S.A.S., Lyon, France) (4).

MATERIEL ET METHODE

1.1. Caractérisation d'isolats du virus de la maladie de Derzsy et du virus de la parvovirose du canard de Barbarie

Le gène VP2 de 5 isolats de virus de la maladie de Derzsy a été amplifié par PCR, séquencé et analysé. Ces prélèvements proviennent d'élevages atteints de maladie de Derzsy dans le Sud-Ouest de la France, collectés entre 2008 et 2010. Le gène VP1 de 14 isolats du parvovirus du canard de Barbarie a été amplifié par PCR, séquencé et analysé. Ces prélèvements proviennent d'élevages de canards de Barbarie atteints de parvovirose, collectés en France entre 2005 et 2014. Le choix des isolats MDPV a été fait conjointement par Meriel et Scanelis de manière à constituer 4 groupes (Tableau 1) : 1 groupe de référence incluant des cas historiques (collection Scanelis), 2 groupes constitués d'isolats de 2011 pour lesquels la clinique a été observée à des âges différents ; 1 groupe d'isolats récents (fin 2013-début 2014) à partir de 4 cas cliniques et d'une souche prélevée dans l'environnement (sélection Meriel). Chaque isolat a été caractérisé et comparé à la souche vaccinale GM199. La souche française de référence (89 384) a été incluse dans l'étude (3).

Tableau 1. Isolats de parvovirus du canard de barbarie

Groupe d'isolats	Id. Scanelis	Date de collecte
Groupe 1	508-169	Mai 2005
Cas historiques (souches références)	508-430	Août 2005
Age des sujets inconnu	607-720A	Juin 2007
Groupe 2	P11050416-1	Mai 2011
Isolats collectés sur des sujets âgés de 3-4 semaines	P11040932-1	Avril 2011
	P11040935-1	Avril 2011
Groupe 3	P11040240-1	Avril 2011
Isolats collectés sur des sujets âgés de 7-8 semaines	P11030975-1	Mars 2011
	P11030973-1	Mars 2011
Groupe 4	P13120178-1**	Décembre 2013
Isolats collectés sur sujets âgés de 3 semaines* à 9 semaines**	P13120738-1*	Décembre 2013
	P14040598-1**	Avril 2014
	P14040632-1*	Avril 2014
Isolat collecté dans l'environnement***	P131209607-9***	Décembre 2013

Les ADN extraits au moment du diagnostic PCR (Derzsy et MDPV) ont été conservés à -20°C et ont servi à l'étude de typage moléculaire. Afin de séquencer les gènes VP1 ou VP2, plusieurs PCR chevauchantes ont été dessinées. Pour chaque échantillon, les produits des PCR ont été séquencés dans les deux sens (sur les deux brins de l'acide nucléique) afin d'obtenir une fiabilité maximale. La construction d'une séquence nucléique consensus pour chaque échantillon a permis de déduire la séquence du gène.

RESULTATS ET DISCUSSION

Analyse des séquences des isolats de virus Derzsy

Les séquences obtenues pour les 5 isolats du virus de la maladie de Derzsy et la souche vaccinale Hoekstra montrent une grande conservation de la séquence ADN du gène VP2. Douze polymorphismes ont été mis en évidence sur les 1764 paires de base (pb) du gène ce qui correspond à un minimum de 99.3% d'identité selon les isolats.

Analyse des séquences des isolats de parvovirus du canard de barbarie

Les séquences obtenues à partir des échantillons de terrain collectés ont été analysées afin d'identifier les polymorphismes nucléotidiques (SNP - Single Nucleotide Polymorphism). Une grande proximité génétique est observée pour l'ensemble des échantillons et en particulier pour 13 des 14 isolats de parvovirus du canard de Barbarie. Cette remarquable conservation de la séquence génétique de la VP1 est en accord avec la très grande stabilité génétique des parvovirus habituellement admise (3,4).

Huit isolats de 2011 à 2014 sont parfaitement identiques à la séquence de la souche de référence (89 384 isolée en France en 1989). Cinq autres isolats de 2013 et 2014 possèdent entre 1 et 4 SNP sur les 2 199 paires de bases du gène de la VP1 (taux de substitution inférieur à 0.2%).

Un des échantillons P13120178-1 présente un nombre élevé de SNP regroupés dans une zone du gène très restreinte (1310-1410). De plus, cette zone de 100 nucléotides regroupant 15 SNP est quasiment identique à la séquence correspondante du gène VP1 du virus de la maladie Derzsy ; ceci laisse supposer que cet isolat pourrait être le résultat d'une recombinaison entre les 2 virus. Ce phénomène a été précisément décrit récemment (5).

Afin de positionner ces isolats de terrain par rapport à la souche GM199, la séquence de cette souche vaccinale a été comparée aux séquences de l'étude. L'ensemble des isolats présente entre 16 et 18 SNP et la souche P13120178-1 (recombinant MDPV/Derzsy) présente 31 SNP. Ce résultat correspond à ce qu'on peut attendre d'une souche vaccinale atténuée présentant donc des caractéristiques propres.

Analyse phylogénétique des isolats de parvovirus du Barbarie

Un arbre phylogénétique illustre la très grande proximité des 14 souches sauvages étudiées et de la souche vaccinale GM199 avec la souche française de référence 89384 (Figure 1). Les séquences de souches isolées en Chine et en Hongrie (AY510603 et X75093) ont été ajoutées afin de compléter cette analyse. Les distances génétiques ont été estimées par la méthode « Juke & Cantor » et l'arbre phylogénétique a été construit grâce à la méthode « Neighbor-joining ».

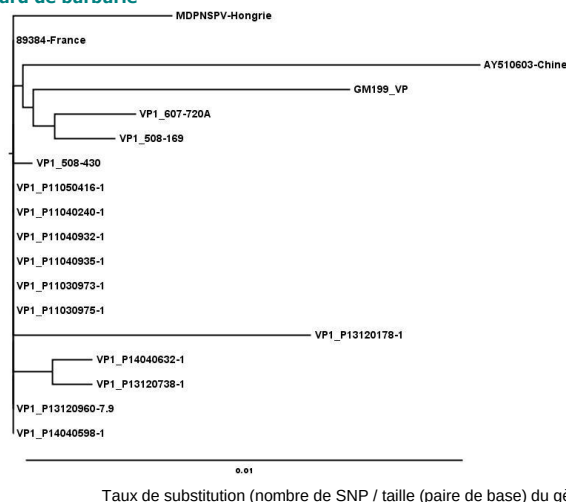
DISCUSSION/CONCLUSION

Les gènes VP1 ou VP2 codent pour les protéines de la capsid des parvovirus qui sont impliquées dans les processus immunitaires des hôtes contre les parvovirus. Il est important de souligner que cette étude indique la proximité des gènes VP1 et VP2 des virus sauvages d'avec ceux des virus vaccinaux Hoekstra et GM199 inclus ici.

Au vu de ces résultats, l'hypothèse de mutations sur la VP1 ou VP2 pouvant expliquer de nouvelles expressions cliniques est à écarter.

Le vaccin vivant MDPV contenant la souche GM199 est donc adapté à la problématique terrain actuelle.

Figure 1: Arbre Phylogénétique - analyse du gène VP1 du parvovirus du canard de barbarie



Taux de substitution (nombre de SNP / taille (paire de base) du gène)

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- (1) JESTIN, V., LE BRAS, M.O., CHERBONNEL, M., LE GALL, G. & BENNEJEAN, G. (1991) Recueil de Médecine Vétérinaire 167, 849-857.
- (2) MAURIN-BERNAUD, L., MERDY, O., LE-GROS, F.X. & GOUTEBROZE, S. (2013) Actes des 10èmes Journées de la recherche avicole et palmipèdes à foie gras du 26-28 mars 2013, La Rochelle, France, pp. 284-288.
- (3) LE GALL-RECULE, G. & JESTIN, V. (1994) Archives of Virology 139(1-2), 121-131.
- (4) CHANG, P.-C., SHIEN, J.-H., WANG, M.-S. & SHIEH, H.-K. Avian pathology (2000), 29, 45-49.
- (5) ZHU, Y.-M., ZHOU, Z.-G., HUANG, Y.-U. (2014), Veterinary Microbiology, China, 10.032

