

SUIVI DE L'ÉVOLUTION GÉNÉTIQUE DES RÉOVIRUS AVIAIRES EN FRANCE (2016-2023) ET PREMIÈRES APPLICATIONS DU SÉQUENÇAGE OXFORD NANOPORE.

Sécula Aurélie, Walch Mathilda, Delpont Mattias, Soubies Sébastien, Guérin
Jean-Luc, Croville Guillaume

IHAP, Université de Toulouse, INRAE, ENVT, 31300 Toulouse

guillaume.croville@envt.fr

RÉSUMÉ

Les manifestations cliniques les plus fréquentes lors d'infections par des réovirus aviaires (ARV) chez le poulet de chair sont des ténosynovites associées à des troubles locomoteurs entraînant une réduction de performances et d'importantes pertes économiques. La prévention des ténosynovites virales à ARV est complexe en raison de l'émergence de souches sauvages échappant à la protection immunitaire conférée par les vaccins commerciaux. Le typage des souches circulantes représente donc un enjeu capital dans une logique de pharmacovigilance afin de pouvoir détecter précocement toute circulation de souches potentiellement émergentes. En 2023, la réovirose aviaire s'est avérée une problématique de terrain majeure avec une recrudescence de cas significative. Entre juin et novembre 2023, 78 cas ont été référés au laboratoire de l'ENVT grâce à la coopération des vétérinaires, des organisations de productions et des accoueurs de 9 départements français. Parmi les 78 suspicions de ténosynovites à réovirus, 69 ont été confirmées par un résultat PCR positif et 48 ont fait l'objet d'un séquençage du gène *sigma C* dans l'optique d'une analyse phylogénétique. Cette analyse phylogénétique a permis de classer les souches recrutées dans notre laboratoire et séquencées au fil de l'eau depuis 2016 dans les *clusters* 1.2, 2 et 4 mais aussi d'établir qu'en 2022 une souche très proche de celles actuellement responsables des épisodes cliniques avait déjà été identifiée. Par ailleurs, des résultats préliminaires de séquençage Oxford Nanopore des génomes complets ont permis de valider l'apport de cette méthode (en se focalisant sur 3 des 10 segments) pour l'étude de la diversité génétique virale et pour l'identification de phénomènes d'évolution des ARV. Ces résultats illustrent l'intérêt de la surveillance génétique des réovirus aviaires associée à une caractérisation génétique fine des souches pathogènes pour détecter précocement l'émergence de nouveaux variants et concourir à la mise à jour des vaccins.

ABSTRACT

Genetic monitoring of french avian reoviruses field cases (2016-2023) and first applications of oxford nanopore sequencing.

The most frequent clinical outcomes of avian reovirus (ARV) infections in broiler chickens are tenosynovitis associated with lameness, leading to poor growth and significant economic losses. Prevention of ARV-induced tenosynovitis is complex, due to the emergence of strains that escape the protection elicited by conventional strains used in vaccines. Typing of circulating strains is thus a key challenge for early detection of any potentially emerging strain. In 2023, ARV infections have been a major field problem in South-west France, with a significant upsurge in cases. Between June and November 2023, 78 cases were referred to our laboratory thanks to the cooperation of veterinarians, production organizations and breeders in 9 French departments. Among the 78 suspected cases of reovirus tenosynovitis, 69 were confirmed by a positive PCR result, and 48 were subjected to *sigma C* gene sequencing for phylogenetic analysis. This phylogenetic analysis made it possible to classify the strains analyzed in our laboratory since 2016 into clusters 1.2, 2 and 4, but also to establish that by 2022 a strain very close to those currently responsible for clinical cases had already been identified. In addition, preliminary results from Oxford Nanopore sequencing of complete genomes have validated the interest of this method for studying the genetic diversity and the identification of evolution mechanisms of ARV. These results illustrate the value of genetic monitoring of avian reoviruses, combined with detailed genetic characterization of pathogenic strains, for early detection of emerging variants, and for helping to update vaccines.

INTRODUCTION

Les ténosynovites virales à réovirus aviaires (ARV) chez le poulet de chair peuvent être uni ou bilatérales et causer des boiteries avec, pour les cas les plus aigus, une rupture du tendon gastrocnémien (Glass et al., 1973). Outre les conséquences économiques liées à une réduction de la qualité des carcasses et d'une moins bonne efficacité alimentaire, ces affections peuvent également avoir une incidence sur le bien-être des animaux touchés à cause de la douleur et des difficultés à se déplacer pour s'abreuver et se nourrir.

Les orthoréovirus aviaires font partie du genre *Orthoreovirus* et appartiennent à la famille des *Spinareoviridae*. Ce sont des virus non-enveloppés dont le génome (23 kb) est composé de 10 segments d'ARN double-brin divisés en 3 classes selon leur taille : 3 grands (L1 à L3), 3 moyens (M1 à M3) et 4 petits (S1 à S4). Chaque segment code pour une protéine, hormis S1 qui code pour 3 protéines non structurales : σ C, p10 et p17. Sigma C est une protéine de capsid ciblée par les anticorps neutralisants et impliquée dans l'attachement des virions à la surface des cellules. La séquence génétique codant pour la protéine σ C est la plus variable du génome des réovirus avec notamment des régions hypervariables identifiées entre les acides-aminés 1 à 122 et 196 à 326 (Guardado Calvo et al., 2005). Cette variabilité de σ C en fait la séquence de choix pour le génotypage des réovirus à l'aide des amorces P1 et P4 (Kant et al., 2003), unanimement employées par la communauté scientifique.

Le contrôle de la maladie s'effectue notamment par la vaccination des poules reproductrices afin de prévenir la transmission verticale du virus. Néanmoins, une transmission horizontale du virus peut également avoir lieu chez les jeunes poussins, au couvoir ou en élevage. En dépit d'une vaccination généralisée avec les valences vivantes S1133 et S1733 appartenant au *cluster* 1 et isolées respectivement en 1973 (Van Der Heide, 1977) et 1989 (Stern et al., 1989), une recrudescence mondiale de ténosynovites causées par les ARV est constatée depuis le début des années 2010 (Ayalew et al., 2017; Lu et al., 2015; Sellers, 2017; Zhong et al., 2016). En France, une actualisation du programme vaccinal a eu lieu avec l'introduction en 2011 d'une valence inactivée (souche 11-12523 (Troxler et al., 2013), *cluster* 1.2) mais ces dernières années des émergences de souches pathogènes des *clusters* 4 (2016, 2023) et 1.2 (2023) ont eu lieu en France.

Il est intéressant de souligner qu'aux États-Unis, malgré une organisation totalement différente des systèmes d'élevages et l'utilisation d'autovaccins viraux, des émergences d'ARV de divers *clusters*

échappant à la pression vaccinale ont été constatées ces dix dernières années (Sellers, 2022).

L'étude présentée ici est un état des lieux de la circulation et de l'évolution génétique des ARV en France depuis 2016 et démontre l'importance de la mise en place d'un protocole de pharmacovigilance pour détecter le plus précocement possible toute circulation de souches pathogènes au potentiel émergent.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Recrutement des cas cliniques et description des prélèvements

Les suspicions de ténosynovites virales à réovirus ont été faites par les vétérinaires des élevages concernés, en France métropolitaine, sur la base du contexte épidémiologique (poulets en fin de croissance, cas similaires dans des lots issus du même parquet de reproducteurs ou du même couvoir), de la présentation clinique (boiterie avec démarche "en cow-boy", appui sur les tarses, gonflement de la région des tendons en regard du tarso-métatarse, voire gonflement de l'articulation tarsienne), et des examens complémentaires éventuels (absence d'isolement de bactéries d'intérêt, analyses histo-pathologiques compatibles). Ces cas ont ensuite été référés à l'ENVIT (UMR IHAP, équipe VIRAL) et les prélèvements de tissus (région des tendons) réalisés (i) soit lors d'autopsies à l'ENVIT, (ii) soit par les vétérinaires sanitaires et envoyés à l'ENVIT. Des prélèvements de poussière sèche par chiffonnettes (poussières sur les murs et le matériel) ont également été réalisés en élevage.

1.2. Extraction des acides nucléiques et PCR de détection

Les tendons ont été broyés au Precellys (Bertin) puis soumis à une étape de digestion à la protéinase K. Les chiffonnettes ont été reprises et malaxées dans 25 ml de PBS 1X.

Les extractions d'acides nucléiques ont ensuite été réalisées à partir de 120 μ L de broyat de tendon ou de surnageant de chiffonnettes avec le kit d'extraction MagFast (IDVet) conformément aux préconisations du fournisseur.

Après une étape de transcription inverse aléatoire avec le kit RevertAid, une PCR quantitative en temps réel ciblant le segment M3 a été réalisée à l'aide du kit LightCycler 480 SYBR Green I.

1.3. Séquençage Sanger du gène sigma C

Une PCR conventionnelle ciblant le gène codant pour la protéine σ C a été réalisée avec les amorces P1/P4 (Kant et al., 2003) et le kit Phusion Hot Start Flex 2X. Après migration sur gel d'agarose à 1% la bande présente autour de 1000 pb a été découpée

puis purifiée avant séquençage Sanger. Le logiciel BioEdit a été utilisé pour l'analyse qualitative et l'alignement des séquences. Enfin, les arbres phylogénétiques ont été réalisés à l'aide de l'outil MAFFT (<https://mafft.cbrc.jp/>) selon la méthode Neighbor-Joining après 1000 répliquats aléatoires (*bootstraps*).

1.4. Séquençage Oxford Nanopore des génomes complets

Douze échantillons dont les valeurs de Ct étaient inférieures à 30 ont été soumis au protocole de séquençage Oxford Nanopore (Tableau 1).

Une première étape de digestion par la DNase I a été réalisée sur ces échantillons avant l'amplification aléatoire des séquences d'ARN par la méthode SISPA (Chrastek et al., 2017). La librairie de séquençage a été produite avec le kit *Native Barcoding* 24 V14 (Oxford Nanopore Technologies) puis chargée sur une *flowcell* R10.4. Le séquençage a duré 6 h 52 min.

Le *basecalling* des données a été réalisé par Guppy (v7.1.4) puis les séquences ont été alignées (minimap2 v2.26, samtools v1.18) sur un jeu de références constitué par les 44 génomes complets *chicken orthoreovirus* disponibles sur GenBank. Les séquences consensus ont été obtenues à l'aide d'iVar v1.4.2.

Enfin, des arbres phylogénétiques ont été construits pour chaque segment selon la méthode décrite précédemment (cf. §1.3).

2. RESULTATS ET DISCUSSION

De juin à novembre 2023, 78 suspicions de ténosynovites virales ont été analysées à l'ENVIT. Sur les 78 suspicions, 69 ont été confirmées par la détection de réovirus aviaire par PCR quantitative en temps réel. Enfin, 48 des 69 cas confirmés ont été génotypés par le séquençage du gène codant pour la protéine σ C.

Un arbre phylogénétique permettant le classement des souches en 5 *clusters* a été réalisé et a permis de classer les souches circulant en France depuis 2016 dans les *clusters* 1, 2, 3 et 4 (Tableau 1).

Afin d'approfondir l'étude des génomes viraux, un séquençage de génomes complets a été entrepris par séquençage Oxford Nanopore Technologies à partir de cultures virales (sur œufs de poules embryonnés) mais aussi de prélèvements primaires afin de s'affranchir des étapes de culture virale. Le séquençage direct d'échantillons de terrain représente un avantage afin de raccourcir les délais d'analyse et pour éviter la perte d'informations pouvant être liée à la culture. Néanmoins, le séquençage de souches virales cultivées est nécessaire pour la validation de lots de vaccins.

En moins de 7 heures de séquençage, le *run* a produit un total de 2.51 Gb soit 5 millions de séquences à la taille médiane de 487 pb.

Les séquences consensus des 10 segments ont été obtenues pour les 12 échantillons séquencés. Néanmoins, au vu de la littérature, nous nous sommes focalisés sur les segments S1, M2 et L3 qui sont les plus variables et donc les plus adaptés à l'étude de l'évolution génétique (Gallardo, 2022). La figure 1 représente les arbres phylogénétiques construits à partir des segments S1, M2 et L3 des 44 génomes complets disponibles sur GenBank et des 12 souches séquencées dans cette étude. Ces dernières sont reliées entre elles par des lignes rouges ou vertes selon leur *cluster* d'appartenance qui est basé sur la séquence du gène σ C du segment S1 (Kant et al., 2003). Ces arbres phylogénétiques permettent dans un premier temps d'identifier des groupes de souches pour lesquelles les 3 segments restent proches les uns des autres, en particulier le groupe de souches colorées en jaune dont S1 appartient au *cluster* 1. Néanmoins il est intéressant de constater qu'une de ces souches (ARV_106764) possède des séquences S1 et L3 directement apparentées à des séquences de virus possédant une S1 de *cluster* 1 mais possède une séquence M2 d'un *cluster* différent.

Différents scénarios sont également constatés à l'observation de la répartition des séquences françaises. En effet, les souches dont S1 appartient au *cluster* 4 présentent des M2 très proches mais pour deux d'entre elles (23378, 23380) le segment L3 correspond à un groupe différent. Il faut également noter que les cas cliniques 23378 et 23380 sont survenus 6 mois après les cas 22628 et 22629 dont les souches partagent S1 et M2 mais possèdent des L3 différentes. Ces exemples (tout comme le cas 21305) illustrent l'existence de phénomènes de réassortiment indiquant une co-circulation de différentes souches virales.

Les observations faites dans cette étude confirment l'intérêt de se concentrer sur d'autres segments génétiques en plus de S1. En effet, les segments M2 et L3 codent pour des protéines de capsid potentiellement déterminantes sur le plan antigénique à prendre en compte pour une classification virale plus complète (Egaña-Labrin et al., 2021).

CONCLUSION

L'analyse génétique des segments S1, L2 et M3 des réovirus aviaires est un champ d'étude à approfondir dans la caractérisation des ARV afin de gagner en précision (i) dans le cadre d'études épidémiologiques et (ii) dans un contexte de pharmacovigilance. La recrudescence récente de cas de ténosynovites virales à ARV soulève la question de la mise à jour des souches vaccinales aujourd'hui

employées en France. Il est manifestement nécessaire d'ajuster la composition des vaccins commerciaux en s'assurant de leur adéquation avec les souches circulantes au-delà du séquençage de *sigma C*. Des essais de séroneutralisation couplés à l'étude des gènes variables devraient aider à prédire l'efficacité de la protection induite par la vaccination. Aussi, une surveillance active aux différents étages de production pourrait permettre de caractériser précocement des souches échappant à la protection vaccinale.

Au-delà du gain de temps apporté par la possibilité de réaliser du séquençage Oxford Nanopore dans

notre laboratoire, la taille des séquences permet un séquençage complet des gènes sans avoir à utiliser les amorces internes nécessaires au séquençage Sanger. L'approche de métagénomique sans *a priori* présente également l'avantage d'être robuste vis-à-vis de la variabilité virale en ciblant tous les ARN de l'échantillon.

À l'avenir, il conviendra d'explorer les génomes complets et d'exploiter les données de métagénomique pour étudier le champ des co-infections virales et bactériennes.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Ayalew, L.E., Gupta, A., Fricke, J., Ahmed, K.A., Popowich, S., Lockerbie, B., Tikoo, S.K., Ojkic, D., Gomis, S., 2017. *Sci Rep* 7, 3565.
- Chrzastek, K., Lee, D.-H., Smith, D., Sharma, P., Suarez, D.L., Pantin-Jackwood, M., Kapczynski, D.R., 2017. *Virology* 509, 159–166.
- Egaña-Labrin, S., Jerry, C., Roh, H.J., da Silva, A.P., Corsiglia, C., Crossley, B., Rejmanek, D., Gallardo, R.A., 2021. *Avian Dis* 65, 530–540.
- Gallardo, R.A., 2022. *Avian Dis* 66, 443–446.
- Glass, S.E., Naqi, S.A., Hall, C.F., Kerr, K.M., 1973. *Avian Dis* 17, 415–424.
- Guardado Calvo, P., Fox, G.C., Hermo Parrado, X.L., Llamas-Saiz, A.L., Costas, C., Martínez-Costas, J., Benavente, J., van Raaij, M.J., 2005. *J. Mol. Biol.* 354, 137–149.
- Kant, A., Balk, F., Born, L., van Roozelaar, D., Heijmans, J., Gielkens, A., ter Huurne, A., 2003. *Vet. Res.* 34, 203–212.
- Lu, H., Tang, Y., Dunn, P.A., Wallner-Pendleton, E.A., Lin, L., Knoll, E.A., 2015. *Sci Rep* 5, 14727.
- Sellers, H.S., 2017. *Vet. Microbiol.* 206, 152–156.
- Sellers, H.S., 2022. *Avian Dis* 66, 420–426.
- Sterner, F.J., Rosenberger, J.K., Margolin, A., Ruff, M.D., 1989. *Avian Dis* 33, 545–554.
- Troxler, S., Rigomier, P., Bilic, I., Liebhart, D., Prokofieva, I., Robineau, B., Hess, M., 2013. *Vet. Rec.* 172, 556.
- Van Der Heide, L., 1977. *Avian Pathol* 6, 271–284.
- Zhong, L., Gao, L., Liu, Y., Li, K., Wang, M., Qi, X., Gao, Y., Wang, X., 2016. *Sci Rep* 6, 35271.

	Nature	Ct (M3)	Cluster	Date
23506	Tendon	23,02	1.2	octobre-2023
23380	Tendon	16,55	4.2	juin-2023
23378	Tendon	21,27	4.2	juin-2023
22629	Tendon	18,47	4.2	novembre-2022
22628	Tendon	28,67	4.2	novembre-2022
21305	Tendon	25,24	1.2	octobre-2021
19210	Culture virale	11,65	4.2	octobre-2019
19179	Culture virale	21,83	4.2	août-2019
19040	Culture virale	17,26	1.2	mars-2019
18006	Culture virale	20,37	1.2	février-2018
16118	Culture virale	24,44	1.1	novembre-2016
16111	Culture virale	11,97	4.1	novembre-2016