



OATAO is an open access repository that collects the work of Toulouse researchers and makes it freely available over the web where possible

This is an author's version published in: <http://oatao.univ-toulouse.fr> : 24106

To cite this version:

BREYSSE, Jean-Pierre . *Etude épidémiologique et virologique des ténosynovites à réovirus variants dans la filière poulet label, France, 2016*. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse – ENVT, 2018, 119 p.

Any correspondence concerning this service should be sent to the repository administrator: tech-oatao@listes-diff.inp-toulouse.fr

ETUDE EPIDEMIOLOGIQUE ET VIROLOGIQUE DES TENOSYNOVITES A REOVIRUS VARIANTS DANS LA FILIERE POULET LABEL, FRANCE, 2016

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

*présentée et soutenue publiquement
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

par

BREYSSE, Jean-Pierre
Né, le 10 janvier 1991 à PERPIGNAN (66)

Directeur de thèse : M. Jean-Luc GUERIN

JURY

PRESIDENT :
M. Jacques IZOPET

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEURS :
M. Jean-Luc GUERIN
M. Stéphane BERTAGNOLI

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE
Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

**Ministère de l'Agriculture de l'Alimentation
ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE TOULOUSE**

Directrice : **Madame Isabelle CHMITELIN**

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

- M. **AUTEFAGE André**, *Pathologie chirurgicale*
- Mme **CLAUW Martine**, *Pharmacie-Toxicologie*
- M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, Statistiques, Modélisation*
- M. **DELVERDIER Maxence**, *Anatomie Pathologique*
- M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*
- M. **FRANC Michel**, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
- M. **PETIT Claude**, *Pharmacie et Toxicologie*
- M. **SHELCHER François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*

PROFESSEURS 1^{re} CLASSE

- M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*
- M. **BERTHELOT Xavier**, *Pathologie de la Reproduction*
- M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Physiologie et Thérapeutique*
- M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et Industrie des aliments d'Origine animale*
- Mme **CHASTANT-MAILLARD Sylvie**, *Pathologie de la Reproduction*
- M. **DUCOS Alain**, *Zootecnie*
- M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- Mme **GAYRARD-TROY Véronique**, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*
- Mme **HAGEN-PICARD Nicole**, *Pathologie de la reproduction*
- M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
- M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et Thérapeutique*
- M. **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- M. **SANS Pierre**, *Productions animales*
- Mme **TRUMEL Catherine**, *Biologie Médicale Animale et Comparée*

PROFESSEURS 2^e CLASSE

- M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et Industrie des aliments*
- Mme **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*
- Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, Anatomie pathologique*
- Mme **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie Vétérinaire*
- M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
- M. **GUERIN Jean-Luc**, *Aviculture et pathologie aviaire*
- Mme **LACROUX Caroline**, *Anatomie Pathologique, animaux d'élevage*
- Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*
- M. **MAILLARD Renaud**, *Pathologie des Ruminants*

PROFESSEURS CERTIFIÉS DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE

Mme **MICHAUD Françoise**, *Professeur d'Anglais*
M **SEVERAC Benoît**, *Professeur d'Anglais*

MAITRES DE CONFERENCES HORS CLASSE

M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la Reproduction*
Mme **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
M. **JOUGLAR Jean-Yves**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*
M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et Mathématiques*
M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*
Mme **MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation*
M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, Imagerie médicale*
Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*
M. **VERWAERDE Patrick**, *Anesthésie, Réanimation*

MAITRES DE CONFERENCES (classe normale)

M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*
Mme **BENNIS-BRET Lydie**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
Mme **BIBBAL Delphine**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
Mme **BOUCLAINVILLE-CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*
Mme **BOUHSIRA Emilie**, *Parasitologie, maladies parasitaires*
M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*
M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*
M. **CUEVAS RAMOS Gabriel**, *Chirurgie Equine*
Mme **DANIELS Hélène**, *Microbiologie-Pathologie infectieuse*
Mme **DAVID Laure**, *Hygiène et Industrie des aliments*
Mme **DEVIERS Alexandra**, *Anatomie-Imagerie*
M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophthalmologie vétérinaire et comparée*
Mme **FERRAN Aude**, *Physiologie*
M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
Mme **LALLEMAND Elodie**, *Chirurgie des Equidés*
Mme **LAVOUE Rachel**, *Médecine Interne*
M. **LE LOC'H Guillaume**, *Médecine zoologique et santé de la faune sauvage*
M. **LIENARD Emmanuel**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie Chirurgicale*
Mme **MILA Hanna**, *Elevage des carnivores domestiques*
M. **NOUVEL Laurent**, *Pathologie de la reproduction (en disponibilité)*
Mme **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
Mme **PAUL Mathilde**, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles et porcins*
M. **VERGNE Timothée**, *Santé publique vétérinaire – Maladies animales réglementées*
M. **RABOISSON Didier**, *Productions animales (ruminants)*
M. **VOLMER Romain**, *Microbiologie et Infectiologie*
Mme **WASET-SZKUTA Agnès**, *Production et pathologie porcine*

ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS

M. **CARTIAUX Benjamin**, *Anatomie-Imagerie médicale*
Mme **COSTES Laura**, *Hygiène et industrie des aliments*
M. **GAIDE Nicolas**, *Histologie, Anatomie Pathologique*
M. **JOUSSERAND Nicolas**, *Médecine interne des animaux de compagnie*



Remerciements

Aux membres du jury de thèse :

A Monsieur le Professeur Jacques IZOPET,

Professeur des Universités

Praticien hospitalier, *Virologie*

Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter la présidence de ce jury de thèse

Hommages respectueux

A Monsieur le Professeur Jean-Luc GUERIN,

Professeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Aviculture et Pathologie aviaire

Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter d'être mon directeur de thèse, pour s'être rendu disponible et m'avoir conseillé malgré son emploi du temps de ministre et enfin pour m'avoir guidé vers la noble voie de l'aviculture,

Mes remerciements les plus sincères et respectueux

A Monsieur le Professeur Stéphane BERTAGNOLI,

Professeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Pathologie infectieuse

Qui m'a fait l'honneur de participer à mon jury de thèse,

Mes remerciements les plus sincères et respectueux

Mes remerciements vont également :

A Luc ROBERTET, Marie SOUVESTRE, Jessica GENIN, Guillaume CROVILLE et toute l'équipe du LabCom VIRAL

Pour leur aide précieuse sur le terrain comme au laboratoire, leur accueil et leur disponibilité, pour avoir répondu à mes questions et m'avoir fourni les informations dont j'avais besoin,

Un grand merci

Table des matières

Liste des abréviations	10
Table des figures	11
Table des tableaux	12
Introduction	12

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE : Connaissances actuelles sur les réoviroses aviaires

1. Les réovirus aviaires.....	15
1.1 Taxonomie.....	15
1.2 Structure	17
1.2.1 La particule virale et son génome.....	17
1.2.2 Les protéines virales	19
1.3 Propriétés physico-chimiques.....	26
1.3.1 Résistance à la température	26
1.3.2 Survie sur des matériaux retrouvés en élevage.....	26
1.3.3 Sensibilité aux variations de pH et aux désinfectants usuels.....	26
1.3.4 Sensibilité à la trypsine.....	28
1.4 Cycle de réplication	29
1.4.1 Réception de la particule virale au niveau de la membrane cellulaire.....	29
1.4.2 Entrée et décapsidation du virus	30
1.4.3 Expression génétique.....	31
1.4.4 Morphogénèse et sortie de la cellule	32
1.5 Modifications cellulaires induites par l'infection virale	33
1.5.1 Apoptose.....	33
1.5.2 Fusion cellule-cellule.....	34
1.5.3 Perméabilisation de la membrane.....	35
1.5.4 Résistance à l'interféron	36
2. La réovirose aviaire.....	38
2.1 Généralités.....	38
2.2 Les arthrites et ténosynovites virales	39
2.2.1 Historique	39
2.2.2 Pathogénèse et épidémiologie	40
2.2.3 Signes cliniques observés lors d'arthrite virale	44
2.2.4 Lésions macroscopiques.....	46

2.2.5	Modifications histologiques	47
2.2.6	Réponse immunitaire à l'infection	49
2.3	Autres implications pathologiques des réovirus	52
2.3.1	Le syndrome de malabsorption	52
2.3.2	Autres atteintes chez <i>Gallus gallus</i>	53
2.3.3	La réovirose chez d'autres espèces avicoles.....	55
3.	Situation actuelle : émergence mondiale de nouveaux variants	56
3.1	De nombreux cas de réovirose décrits ces 20 dernières années.....	56
3.2	Le variant ERS.....	56
3.2.1	Découverte et isolement de la souche.....	56
3.2.2	Infection expérimentale d'individus SPF par la souche isolée	57
3.2.3	Des caractéristiques sérologiques différentes des souches connues	58
3.2.4	Autres cas impliquant le variant ERS par la suite	58
3.3	Réovirus émergents aux Etats-Unis.....	59
3.3.1	Manifestations cliniques.....	60
3.3.2	Lésions observées après autopsie	60
3.3.3	Caractérisation des souches	60
3.3.4	Autre exemple dans la même région	61
3.4	Exemple d'épisodes cliniques au Canada.....	61
3.4.1	Signes cliniques, lésions et évaluation de la séroprévalence	62
3.4.2	Caractérisation des agents pathogènes	62
3.5	Emergence de cas en France en 2011-2012.....	63
3.5.1	Contexte.....	63
3.5.2	Résultats	63
3.5.3	Discussion et conclusion	66
3.6	Résumé d'autres cas d'émergence rapportés	66
3.6.1	Tunisie (Kort et al., 2015)	66
3.6.2	Chine	67
3.7	Conclusion sur ces exemples	67
4.	Stratégies de diagnostic et de lutte contre la réovirose.....	68
4.1	Méthodes de diagnostic	68
4.1.1	Diagnostic clinique et nécropsique.....	68
4.1.2	Apport de l'histologie.....	69
4.1.3	Mise en évidence directe du virus	70
4.1.4	Techniques sérologiques	75
4.1.5	Méthodes de typage des réovirus aviaires	78
4.1.6	Virulence et tropisme des souches.....	81

4.2	Les méthodes de lutte passent essentiellement par la vaccination.....	82
4.2.1	La vaccination contre la réovirose.....	83
4.2.2	L'adaptation de la prophylaxie face aux limites de la vaccination classique	85

PARTIE EXPERIMENTALE

Etude épidémiologique et virologique de cas émergents de réovirose dans le Sud-Ouest de la France chez des poulets Label Rouge, 2016-2018

1.	Contexte	89
2.	Matériel et méthode.....	90
2.1	Critères d'inclusion des élevages dans l'étude	90
2.2	Visite d'élevage et prélèvements réalisés	90
2.3	Autopsie et prélèvements réalisés.....	91
2.4	Analyse virologique.....	91
2.4.1	Isolement du virus	91
2.4.2	Transcription inverse, réaction de polymérisation en chaîne (RT-PCR) et séquençage.....	92
3.	Résultats	94
3.1	Signes cliniques	94
3.2	Pesées	94
3.3	Autopsies	97
3.4	Examen histologique	98
3.5	Analyse virologique.....	98
3.6	Analyse des épitopes	100
4.	Discussion	101
	Conclusion générale	105
	Références bibliographiques.....	110

Liste des abréviations

ARNsb : Acide RiboNucléique simple-brin

ARNdb : Acide RiboNucléique double-brin

ARV : Avian orthoreovirus = Orthoréovirus aviaire

CEF : Chicken Embryo Fibroblast = Cellules primaires de fibroblastes d'embryon de poulet

DIVA : Differentiating Infected from Vaccinated Animals

DRV : Duck reovirus = réovirus du canard

ECP : Effet cytopathogène

GRV : Goose reovirus = réovirus de l'oie

IFN : Interféron

ISVP : Infectious Subviral Particle = particule subvirale infectieuse

LMH : Leghorn Male Hepatome = cellule de carcinome de foie de poulet

MRV : Mammalian orthoreovirus = Orthoréovirus des mammifères

PKR : Protein Kinase RNA-activated

SPF : Specific Pathogen Free = EOPS : Exempt d'Organismes Pathogènes Spécifiés

TRV : Turkey orthoréovirus = Réovirus de la dinde

Table des figures

Figure 1 : Place des ARV dans l'arbre phylogénétique des Reoviridae (d'après International Committee on Taxonomy of Viruses, King 2012).....	16
Figure 2 : Structure virale des Orthoréovirus aviaires (d'après ViralZone 2013).....	17
Figure 3 : Cycle de réplication des réovirus aviaires (Benavente, Martínez-Costas, 2007).....	29
Figure 4 : Maturation des orthoréovirus (ViralZone 2013).....	31
Figure 5 : Posture anormale chez un poulet Label Rouge atteint d'arthrite virale (Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse).....	45
Figure 6 : 1) A gauche : Gonflement unilatéral du tendon gastrocnémien chez un poulet Label (ENVT) 2) A droite : Rupture du tendon fléchisseur des doigts chez un poulet standard de 32 jours (Sellers 2017)	46
Figure 7 : Coupe histologique de tendon dans un cas d'arthrite virale (coloration Hémalun-Eosine). (Troxler et al, 2013).....	48
Figure 8 : Cas de ténosynovites et arthrites reportés sur la période 2004-2016 - Poultry Diagnostic and Research Center, University of Georgia, Athens, GA, USA (Sellers, 2017)	59
Figure 9 : Arbre phylogénétique montrant les 5 clusters des reovirus aviaires (Troxler et al., 2013).65	
Figure 10 : Arbre phylogénétique des souches isolées en 1980-2000 aux Pays-Bas et en Belgique.....	80
Figure 11 : Comparaison des poids (en kg) des animaux sains et malades dans 3 lots.	96
Figure 12 : Thermographies de tendons gastrocnémiens inflammés (atteinte unilatérale à droite et bilatérale sur la photo de gauche).....	97
Figure 13 : Arbre phylogénétique regroupant les différents isolats de 2016 et 2018. Encadrés en rouge : isolats décrits dans ce travail. Flèches bleues : souches vaccinales	99

Table des tableaux

Tableau 1 : Récapitulatif des différents segments du génome des orthoréovirus aviaires avec leurs protéines associées. Sont également précisées la localisation et la fonction de ces dernières (D'après Benavente, Martínez-Costas 2007).	20
Tableau 2 : Efficacité de certains désinfectants sur les réovirus aviaires (d'après Jones, 2000 ; 2013)	27
Tableau 3 : Périodes d'incubation d'un réovirus aviaire chez un poulet de 2 semaines en fonction de la voie d'infection (d'après Jones, 2013).....	44
Tableau 4 : Identification de souches de réovirus selon leur pattern de réaction aux anticorps monoclonaux (d'après Van Loon et al, 2001)	78
Tableau 5 : Association entre quelques souches et les symptômes qu'elles provoquent	81
Tableau 6 : Programme de la réaction de PCR. La partie en gris est reproduite sur 35 cycles.....	93
Tableau 7 : Résultats des pesées réalisées sur les 3 lots d'âge différents.....	95

Introduction

Les affections de l'appareil locomoteur sont des dominantes pathologiques en aviculture.

Parmi ces affections, les arthrites occupent une part importante et peuvent causer des troubles de santé, avec un fort impact économique.

Les réovirus aviaires sont des agents responsables d'arthrites et ténosynovites virales, maladies qui leur ont été associées dans les années 70.

Les connaissances sur les réovirus aviaires, leur structure et leur biologie, ont été acquises pour l'essentiel dans les années 80. La mise en place de la vaccination a notamment constitué un progrès majeur à cette époque.

Cette dernière a permis en effet de contrôler l'impact de la maladie et les cas de réovirose clinique se sont considérablement raréfiés. L'intérêt pour cette entité a alors périclité.

Cependant, suite à l'émergence de nouveaux foyers engendrés par des réovirus variants échappant à la réponse vaccinale, un intérêt tout particulier a été porté sur l'étude des propriétés de ces virus.

Cette étude a pour objectifs d'une part, de détailler l'état des connaissances actuelles sur les réovirus aviaires et, d'autre part, de présenter des données originales sur l'émergence de réovirus variants en France dans une partie expérimentale.

Dans une première partie, nous effectuerons une revue de la bibliographie pour mieux comprendre les caractéristiques des réovirus, des maladies qu'ils engendrent et des stratégies développées pour y remédier.

Nous décrirons d'abord les caractéristiques du virus avant de nous intéresser aux réoviroses (arthrite virale et syndrome de malabsorption notamment). Nous verrons ensuite différents exemples de réémergence décrits dans la littérature et les stratégies de diagnostic et de lutte développées contre ces variants.

Une deuxième partie, expérimentale, traitera des cas d'émergence de réovirose chez des poulets Label depuis 2016 dans le Sud-Ouest de la France.

On y développera les investigations cliniques et virologiques qui ont été mises en œuvre.

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE :

Connaissances actuelles sur les
réoviroses aviaires

1. Les réovirus aviaires

1.1 Taxonomie

Les virus impliqués dans la réovirose aviaire, font partie de la famille des *Reoviridae* (appelés plus communément Réovirus), sous-famille des Spinareovirinéés et genre Orthoréovirus. (International Committee on Taxonomy of Viruses, King, 2012)

Le terme de Réovirus vient de « *Respiratory, enteric orphan* » (Respiratoire, entérique et orphelin). Les termes de « respiratoire » et « entérique » correspondent aux localisations où le virus a été découvert en premier lieu chez l'Homme.

Un virus est qualifié « d'orphelin » lorsqu'il a été identifié mais qu'aucune maladie n'a pu clairement lui être associée.

La famille des *Reoviridae* est composée de virus non-enveloppés à ARN double-brin (groupe III dans la classification de Baltimore), possédant une capsidie icosaédrique comportant 2 ou 3 couches protéiques.

La sous-famille des *Spinareovirinae* est caractérisée par la présence « d'épines » ou « tourelles » protéiques de taille relativement importante situées au niveau des sommets de l'icosaèdre que forme la particule virale.

Au sein du genre *Orthoreovirus*, on compte 5 espèces :

- Les orthoréovirus aviaires qui seront le sujet de cette étude. On utilisera le terme de réovirus aviaire, plus communément employé dans la suite de l'étude. L'abréviation ARV sera également employée.

Ils ont la particularité de posséder des propriétés dites « fusogènes ».

Cela signifie qu'ils vont provoquer la fusion entre elles des cellules de l'hôte infecté, conduisant à la formation de ce qu'on appelle des syncytia.

NB : Le terme de réovirus aviaire désigne les réovirus des oiseaux en général mais est également employé pour désigner les réovirus affectant *Gallus gallus*.

On emploie des termes spécifiques pour les réovirus de la dinde (TRV, Turkey Reovirus) du canard (DRV, Duck Reovirus) et de l'oie (GRV, Goose Reovirus) car des études récentes ont montré que ces virus possédaient des caractéristiques particulières.

Les autres espèces regroupent :

- Des orthoréovirus mammaliens qui sont, contrairement à leurs homologues aviaires, dit « non-fusogènes »
- Deux autres espèces d'orthoréovirus mammaliens fusogènes, plus marginales, ayant pour hôte respectivement les chauves-souris (Virus de Nelson Bay) et les babouins.
- Des orthoréovirus fusogènes isolés chez les reptiles.

La place des orthoréovirus aviaires dans la famille des Reoviridae est illustrée dans l'arbre phylogénétique ci-dessous (Figure 1)

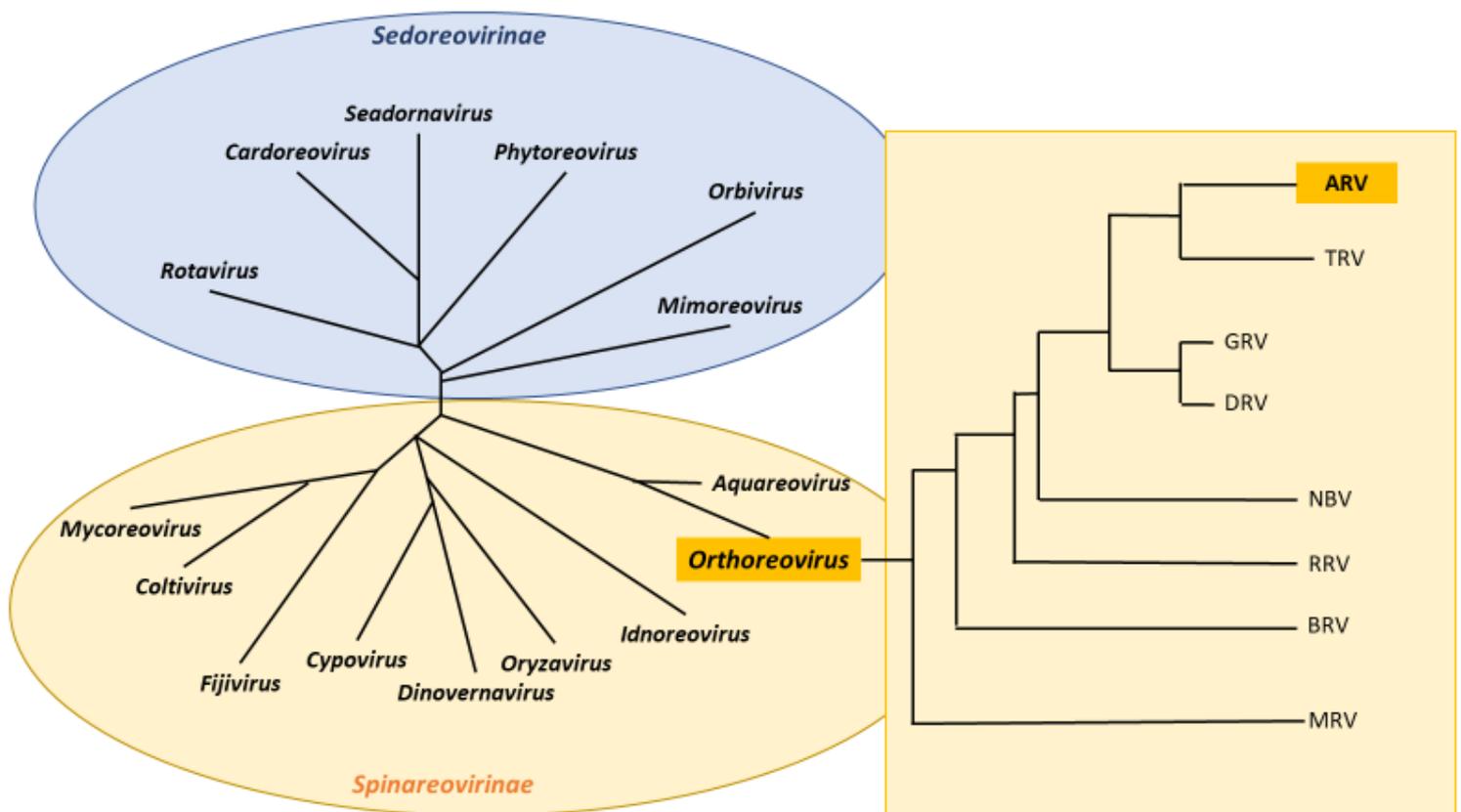


Figure 1 : Place des ARV dans l'arbre phylogénétique des Reoviridae (d'après International Committee on Taxonomy of Viruses, King 2012)

Les espèces associées aux oiseaux et aux mammifères sont les principales représentantes des orthoréovirus.

Malgré des similitudes morphologiques et physico-chimiques, ces deux groupes possèdent des différences au niveau de leurs propriétés fusogéniques et leur spécificité d'hôte (comme évoqué précédemment) mais également au niveau de leur pathogénicité, leur codage génomique ainsi que d'autres facteurs biologiques variés.

Les réovirus aviaires ont également un pouvoir hémagglutinant inférieur à leurs équivalents chez les mammifères.

Ces caractéristiques seront développées dans la suite de l'étude.

1.2 Structure

1.2.1 La particule virale et son génome

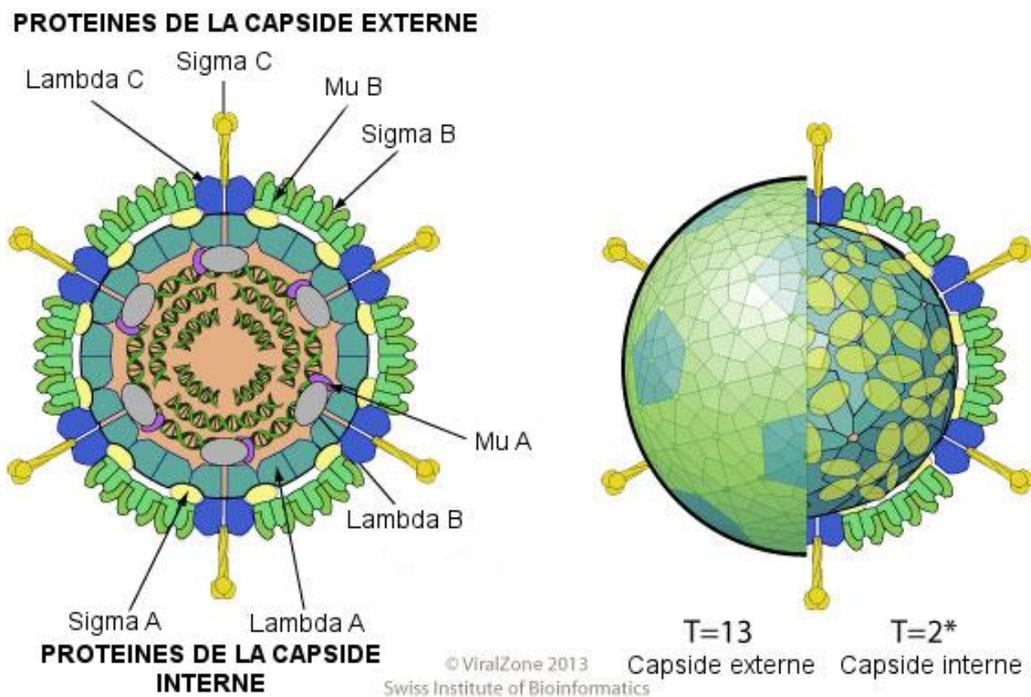


Figure 2 : Structure virale des Orthoréovirus aviaires (d'après ViralZone 2013)

La forme icosaédrique des Orthoréovirus est considérée comme quasi-sphérique avec une capsidie protéique possédant 2 couches (une interne de 60nm de diamètre et une externe de 85nm de diamètre).

La capsidie protéique interne est complète et voit s'insérer les épines caractéristiques des spinaréovirines tandis que la capsidie externe est incomplète pour permettre à des structures protéiques appelées « tourelles » d'émerger à la surface de la particule virale (International Committee on Taxonomy of Viruses, King, 2012).

Au sein de cette capsidie, un compartiment central (48nm de diamètre) contient 10 molécules d'ARN double-brin linéaire de différentes tailles :

- 3 longues ou « large » (L1, L2, L3)
- 3 moyennes ou « medium » (fM1, M2, M3)
- 4 courtes ou « small » (S1, S2, S3 et S4).

Ces molécules ont été ordonnées en fonction de leur profil de migration sur gel d'électrophorèse. Chaque fragment, suite à l'étape de traduction, conduira à la formation d'une protéine particulière. Le gène S1 fait exception, dans la mesure où sa traduction conduira à la formation de 3 protéines.

Les protéines virales seront détaillées par la suite.

En plus de ces molécules d'ARN bicaténaire, on trouve également de courts oligonucléotides d'ARN simple brin, qui sont riches en adénine et dont la fonction reste inconnue.

Comme pour les autres réoviridés, lors de la co-infection d'une cellule par deux souches de réovirus aviaire, la descendance produite peut contenir des fragments de génomes des 2 souches parentales. On appelle ce phénomène le réassortiment, sur le même mode que pour les virus grippaux. Ces réassortiments sont utiles pour caractériser le phénotype propre aux différents segments du génome (Benavente, Martínez-Costas, 2007).

1.2.2 Les protéines virales

La traduction du génome des réovirus aviaires conduit à la formation de 12 produits :

- 8 protéines de structure du virus : elles seront parties intégrantes de la descendance virale
- 4 autres protéines, dites non-structurales : elles sont retrouvées dans les cellules infectées mais pas dans les virions matures. (Martínez-Costas et al., 1997)

Les protéines codées à partir des 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 (la protéine λ_A migrera moins loin que λ_B par exemple).

Ce classement permet de différencier les protéines produites par les orthoréovirus aviaires de celles de leurs équivalents propres aux mammifères, un chiffre étant associé à ces dernières (λ_1 , $\lambda_2, \lambda_3 \dots$).

En plus des 8 protéines de structures évoquées précédemment (λ_A , λ_B , λ_C , μ_A , μ_B , σ_A , σ_B , σ_C), on en trouve 2 supplémentaires issues d'un clivage post-traductionnelle de μ_B appelées μ_{BN} et μ_{BC} (N et C correspondant aux extrémités N-terminale et C-terminale).

Les protéines non structurales, μ_{NS} (qui, comme μ_B , se scinde en μ_{NSN} et μ_{NSC}) et σ_{NS} , sont issues de la traduction respectivement des gènes M3 et S4 et sont aisément détectées dans le cytoplasme de cellules infectées.

Parmi les autres protéines non structurales, les protéines p10 et p17 sont issues toutes deux du gène S1 (Benavente, Martínez-Costas, 2007).

L'ensemble de ces informations est résumé dans le Tableau 1 ci-dessous :

Segment de génome	Protéine	Localisation	Fonction
L1	λA	Capside interne	Charpente de la capside interne
L2	λB	Noyau interne	ARN polymérase (fonction présumée)
L3	λC	Pentamère formant des « tourelles »	Enzyme de « capping » (coiffe de l'ARN)
M1	μA	Noyau interne	Co-facteur de la transcriptase (fonction présumée)
M2	$\mu B, \mu BN, \mu BC$	Capside externe	Internalisation de la particule virale
M3	$\mu NS (\mu NSC, \mu NSN)$	Non structurales	Formation des usines virales et recrutement des protéines
S1	σC p10 p17	Capside externe Non structurale Non structurale	Attachement à la cellule Perméabilisation et caractère fusogénique Interaction nucléocytoplasmique sur la cellule infectée ?
S2	σA	Noyau interne	Liaison à l'ARN double-brin et activité anti-interféron
S3	σB	Capside externe	Formation d'anticorps spécifiques de groupe
S4	σNS	Non structurale	Attachement à l'ARN simple brin

Tableau 1 : Récapitulatif des différents segments du génome des orthoréovirus aviaires avec leurs protéines associées. Sont également précisées la localisation et la fonction de ces dernières (D'après Benavente, Martínez-Costas 2007).

1.2.2.1 Les protéines de structure

Protéine λ A

C'est une protéine de structure du noyau interne de la particule virale. Ce noyau abrite à la fois l'ARN double brin et la ARN polymérase. λ A est synthétisée rapidement lors de l'infection de la cellule par le virus.

Il a également été évoqué une possible interaction entre λ A et la protéine μ NS, cette dernière semblant permettre le recrutement de la première dans les usines virales (Tourís-Otero et al., 2004)

Protéine λ B

Le séquençage de cette protéine ainsi que de son gène associé (L2) a été réalisé en 2008 par Xu et al. D'après leurs travaux, cette protéine serait constitutive de l'ARN polymérase.

Elle serait également la protéine la plus conservée entre les ARV et les MRV. (Xu, Coombs, 2008)

Protéine λ C

Elle correspond aux « tourelles » partant des sommets de l'icosaèdre viral (Zhang et al., 2005),

Elle a été identifiée comme formant le complexe « d'enzymes coiffantes » des orthoréovirus aviaires.

Ce complexe va réaliser une succession de réactions (hydrolyse d'un phosphate puis ajout d'un guanylate et d'un groupement méthyle) et ajouter ainsi une « coiffe » aux ARN messagers ou ARNm (Hsiao et al., 2002).

C'est cette étape de maturation des ARNm qui permet ensuite leur traduction en protéine.

Protéine μA

La structure de μA a été décrite mais la fonction et les propriétés de cette protéine restent encore mal caractérisées.

On sait que son équivalent chez les mammifères est la protéine $\mu 2$.

Elle permet notamment, suite à l'association avec μNS , l'attachement de la machinerie virale aux microtubules. Cependant, un parallèle est difficile avec la biologie des reovirus aviaire, dans laquelle les microtubules ne semblent pas impliqués (Tourís-Otero et al., 2004).

Protéine μB

D'un point de vue structural, la protéine μB (issue de la traduction du gène M2) possède des groupements myristiques (groupement à 14 atomes de carbone) au niveau de son extrémité N-terminale. Cette protéine participe à l'entrée de la particule virale dans la cellule et à l'activation de la transcriptase (O'Hara et al., 2001).

Dans les cellules infectées, μB va se scinder en 2 molécules : μBN et μBC . Elles correspondent respectivement à l'extrémité amino-terminale comportant les groupements myristiques et à l'extrémité C-terminale.

Ces deux produits du clivage de μB participent à la structure de la capsid externe. La protéine σB , dont le rôle sera détaillé plus loin, pourrait participer à la réaction de scission de μB .

Protéine σA

Elle est issue de la traduction de la portion S2 du génome viral et est un constituant de la couche externe du cœur virale. Elle a la particularité de pouvoir de lier à l'ARN double-brin avec une haute affinité. Cette capacité de liaison à l'ARN db a été relié à une activité anti-interféron.

En effet, l'interféron permet l'activation d'une trentaine de protéines, dont la PKR (Protéine Kinase activée par l'ARN). Cette dernière possède une activité antivirale en limitant la synthèse protéique du virus.

σA aurait alors la faculté, en se fixant sur l'ARNdb, d'inhiber l'action de l'enzyme PKR et donc de permettre à la synthèse protéique virale de pleinement s'exprimer (Gonzalez-Lopez, 2003).

Protéine σ B

σ B est associée à la partie S3 du génome viral et on la retrouve au niveau de la capsid externe, dont elle est un élément majeur.

Contrairement à son équivalent chez les réovirus des mammifères (σ 3), elle ne possède pas de capacité de liaison à l'ARNdb. Elle n'engendrerait donc pas d'action anti-interféron.

Elle participe à la structure du virus et conduit à la formation d'anticorps neutralisants groupe-spécifiques (communs à tous les réovirus).

Peu de résultats ont été obtenus concernant d'autres éventuelles fonctions (Benavente, Martínez-Costas, 2007).

Protéine σ C

C'est une protéine relativement petite (326 acides aminés) qui est présente en faible quantité dans la capsid par rapport aux autres protéines virales. Il s'agit d'un homotrimère (protéine composée de 3 unités identiques de polypeptides) composé de deux domaines. La « tête » est situé à l'extrémité C-terminal et la « queue » à l'extrémité N-terminal.

Comme explicité dans le Tableau 1, c'est elle qui permet l'attachement du virion à la cellule et elle est localisée sur la partie externe de la capsid.

Elle joue également un rôle dans l'induction de l'apoptose, une étude conduite en 2004 ayant montré que des cellules transfectées avec de la protéine σ C exprimaient des signes d'apoptoses (Shih et al., 2004) .

Deux caractéristiques de cette protéine σ C sont intéressantes :

- Elle est la plus variable au sein des différentes souches de réovirus, les acides aminés 1 à 122 et 196 à 326 étant considérés comme hypervariables (Guardado Calvo et al., 2005)
- Elle conduit à la production d'anticorps neutralisant l'infection qui sont spécifiques d'un type de réovirus

Pour ces 2 raisons, σ C est une protéine d'intérêt qui permet la distinction entre les différentes souches de réovirus.

Selon les études, les orthoréovirus aviaires ont pu ainsi être séparés en différents groupes génétiques, appelés « clusters » en fonction des séquences codant pour la protéine σ C.

La classification antigénique permet une distinction plus fine entre les souches. En effet, des virus regroupés sous le même sérotype peuvent être distingués par leur protéine sigma C.

La classification en cluster sera développée plus loin dans l'étude (Goldenberg et al., 2010)

1.2.2.2 Les protéines non-structurales

Protéine μ NS

Cette protéine fait partie des principales protéines dites « non-structurales ». Elle est formée à partir du gène M3.

Pour comprendre le rôle de μ NS, il faut savoir que les ARV forment des structures appelées « usines virales » lors de leur réplication dans l'organisme infecté. Ces dernières correspondent à des inclusions cytoplasmiques, sans membranes ni organites cellulaires et composées de protéines structurales comme non-structurales.

D'après Touris-Otero et al., la protéine μ NS est capable de reproduire des inclusions semblables lorsqu'elle est transfectée à des cellules et qu'elle s'exprime individuellement, en l'absence d'autres facteurs viraux. Cela suppose qu'elle est le facteur minimum nécessaire à la formation des usines virales (Tourís-Otero et al., 2004).

De plus, l'étude de l'interaction entre μ NS et les autres protéines virales exprimées par les cellules transfectées a révélé que celle-ci jouait un rôle important dans les premières étapes de la morphogénèse virale et que le processus de recrutement des protéines virales dans les inclusions cytoplasmiques était sélectif et contrôlé dans le temps. Contrairement aux réovirus des mammifères, la formation des usines virales n'est pas liée aux microtubules (Brandariz-Nunez et al., 2010).

Protéine p10

Protéine non-structurale synthétisée à partir du gène S1, la protéine p10 est responsable des propriétés fusogéniques des réovirus aviaires.

Il a été également remarqué que les cellules transfectées avec de la protéine p10 formaient non seulement un syncytium mais entraient également en apoptose.

La protéine p10 serait donc à la fois un agent favorisant la fusion cellule-cellule mais induisant également le mécanisme d'apoptose de la cellule hôte.

Il est également supposé que la dégradation rapide de cette protéine p10 correspond à une des stratégies majeures de défense de l'organisme face à l'infection par les réovirus (Shmulevitz et al. 2004 ; Salsman et al. 2005).

Protéine p17

Elle est obtenue par la traduction d'une des parties du gène S1 (les deux autres codant pour p10 et σ C). Le rôle de cette protéine était inconnu jusqu'à récemment. Des études ont montré que p17 agissait comme une nucléoporine, c'est-à-dire comme une protéine de transport nucléaire au niveau de la cellule hôte infectée. De nombreuses molécules rentrent en jeu dans la fonction de p17. Cette dernière agit tout d'abord en supprimant la fonction d'une autre nucléoporine, Tpr (Wei-Ru Huang et al., 2015) .

Une fois Tpr inactivée, des molécules s'accumulent dans le noyau de la cellule hôte, conduisant au final à la perturbation des voies de signalisation régulant la traduction, le cycle cellulaire et la formation d'autophagosome permettant à l'infection virale d'être productive (Costas et al., 2005 ; Liu et al., 2005) .

Protéine σ NS

Cette protéine non-structurale est issue de la traduction de la partie S4 du génome.

Elle a la capacité de se lier étroitement à l'ARNsb *in vivo* sous forme de complexes ribonucléoprotéiques intracytoplasmiques. On la retrouve dans les inclusions cytoplasmiques formées par les réovirus en association avec μ NS (Touris-Otero, 2005) .

Même si elle ne semble pas avoir une affinité particulière pour l'ARN viral, cette protéine est supposée jouer un rôle dans la réplication et la morphogénèse virales.

1.3 Propriétés physico-chimiques

1.3.1 Résistance à la température

Les réovirus sont résistants à une grande gamme de température. En témoigne les temps de survie suivants (Jones, 2013):

- 8-10 heures à 60°C
- 22-24 heures à 56°C
- 15-16 semaines à 37°C
- 48-51 semaines à 22°C
- Plus de 3 ans à 4°C
- Plus de 4 ans à -20°C
- Plus de 10 ans à -63°C

1.3.2 Survie sur des matériaux retrouvés en élevage

Une étude (Savage, Jones, 2003) s'est intéressée à la durée de vie des ARV sur différents matériaux pouvant être présents dans un bâtiment d'élevage.

Il en ressort que les réovirus aviaires peuvent survivre jusqu'à 10 jours sur des plumes, des coquilles d'œufs, des copeaux de bois, du verre, du caoutchouc et du métal galvanisé et jusqu'à 10 semaines dans l'eau de boisson (avec un pouvoir d'infection limité).

1.3.3 Sensibilité aux variations de pH et aux désinfectants usuels

La particule virale est fortement résistante aux conditions ioniques extrêmes et aux valeurs de pH comprises entre 3 et 9.

Le tableau 2 résume la sensibilité des orthoréovirus à différents produits désinfectants :

Produits	Sensible	Résistant
Ether		+
Chloroforme	+ (légèrement sensible)	
LYSOL 2% (Ammonium quaternaire)		+
Formaldehyde 3%		+
Ethanol 70%	+	
Peroxyde d'hydrogène 5%	+	
Iode organique 0.5%	+	
Phénol 2%	+ (inactivation partielle)	

Tableau 2 : Efficacité de certains désinfectants sur les réovirus aviaires (d'après Jones, 2000 ; 2013)

Une étude s'est intéressée à l'efficacité de 5 désinfectants communément employés au Minnesota sur des réovirus de la dinde (3 souches responsables d'arthrites et une liée à des entérites, respectivement TARV-MN2, TARV-MN4, TARV-O'neil et TERV-MN1) et une souche de réovirus de poulet causant des arthrites (CARV-1) (Mor et al., 2015).

Les 5 désinfectants étaient globalement composés :

- D'ammonium quaternaires et d'aldéhyde (VIROCID®, SYNERGIZE®)
- De phénol (ONE STROKE®, TEK TROL®)
- D'agents oxydant, notamment du peroxyde d'hydrogène (KENO X5®)

Il ressort de cette étude que les différents réovirus étudiés étaient inactivés par ces 5 désinfectants commerciaux aux concentrations recommandées.

Quelques différences ressortent cependant avec un temps d'inactivation plus long pour les souches TARV-O'neil (dinde) et poulets (CARV-1). L'inactivation totale (>99.9%) se faisait en effet après 5 à 10 minutes de temps de contact pour ces 2 souches (contre 2 à 5 minutes pour les autres).

On peut noter également que des expérimentations *in vitro* ont montré l'action anti-virale d'extraits végétaux sur différents virus aviaires dont les réovirus.

Il s'agit d'extrait de bois de noisetier et quebracho (Lupini et al., 2009) ainsi que de graines de *Guettarda angelica* (Barros et al., 2013).

En résumé, les réovirus étant résistants à la chaleur, aux enzymes protéolytiques, à des désinfectants variés et possédant une résistance sur un large spectre de pH, il est quasi impossible de maintenir des élevages indemnes de réovirus (Jones, 2000) .

1.3.4 Sensibilité à la trypsine

La sensibilité des réovirus à la trypsine semble varier entre les souches, mais ne semble pas liée à une configuration antigénique ni à une espèce hôte particulières.

Le lien entre la pathogénicité d'une souche et sa sensibilité à la trypsine n'est pas bien établi. On peut cependant noter que les souches sensibles à la trypsine se multiplient faiblement dans l'intestin et ne se disséminent pas à d'autres tissus (Jones et al., 1994) .

Il a également été démontré que le risque de transmission verticale était plus élevé pour une souche résistante à la trypsine par rapport à une souche sensible (Al-Muffarej et al., 1996) .

1.4 Cycle de réplication

L'ensemble du cycle de réplication du virus est résumé dans la Figure 3 :

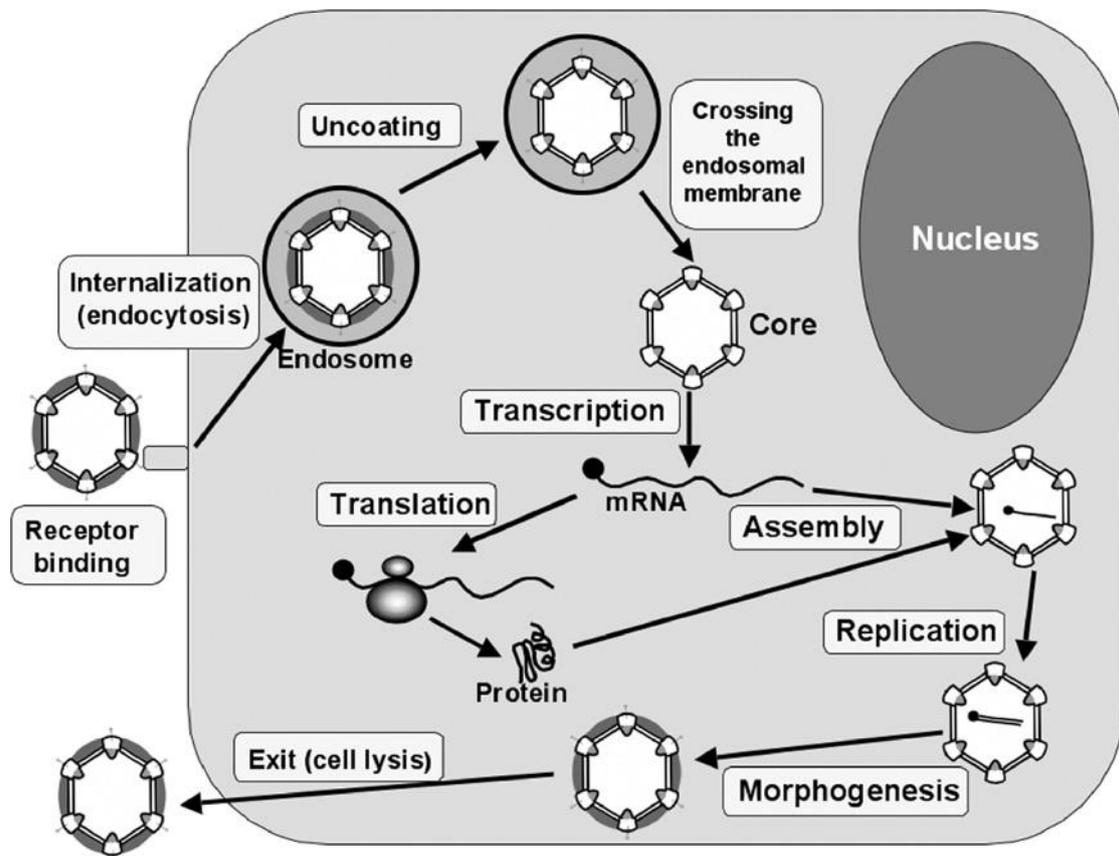


Figure 3 : Cycle de réplication des réovirus aviaires (Benavente, Martínez-Costas, 2007)

1.4.1 Réception de la particule virale au niveau de la membrane cellulaire

Lorsque le virus arrive au niveau de la membrane cellulaire, une interaction spécifique a lieu entre la protéine σC de la capsid externe et un récepteur membranaire extra-cellulaire. La nature de ce récepteur n'est pas complètement déterminée.

Une étude (Benavente et al, non publié) suggèrerait que c'est un récepteur protéique et que les conjugués d'autre nature ne sont pas impliqués. En effet, l'attachement du virus à la cellule se faisait en présence de glycosidase, lipase, EDTA (chélateur de métaux) et periodate de sodium (un oxydant).

L'acide sialique, dérivé de sucre impliqué dans de nombreuses réactions de liaison pathogène-hôte (notamment celle des réovirus mammaliens) ne semble donc pas intervenir ici. On peut signaler également que la particule virale aviaire a la capacité de se lier et de se répliquer en présence de cellules d'oiseaux comme de mammifères. Le récepteur cellulaire aux réovirus aviaires serait donc un récepteur protéique ubiquitaire. Ce n'est pas le cas pour son équivalent chez les mammifères (Barton et al., 2001).

1.4.2 Entrée et décapsulation du virus

Suite à la liaison entre le récepteur membranaire et la particule virale, cette dernière va traverser la membrane pour se répliquer dans la cellule. L'entrée du virion non-enveloppé va se faire par endocytose.

Une fois dans la vésicule d'endocytose, le réovirus aviaire va subir une décapsulation : les protéines de la capsid vont être lysées au niveau de l'endosome (organite intracellulaire où vont se fusionner les vésicules d'endocytose).

La décapsulation serait notamment permise par l'acidification du virus grâce aux pompes à protons ATP-dépendantes des endosomes et/ou par l'action des protéases lysosomales.

C'est la protéine μ BC, composant majeur de la capsid externe, qui va notamment être concernée par cette protéolyse. Une fois lysée, elle va conduire à la formation de deux produits : les polypeptides δ et δ' .

Ces 2 polypeptides sont obtenus par 2 opérations de clivages successives. Chez les réovirus associés aux mammifères en revanche, on observe une seule scission. Le rôle du deuxième clivage (permettant l'obtention de δ') est encore inconnu.

Cet enchainement de lyse protéique génère des particules virales parentales pourvues d'une capsid externe partielle (*Infectious Subviral Particles* ou ISVP) voire ne possédant plus de capsid virale externe. Cette maturation des orthoréovirus est illustrée dans la Figure 4.

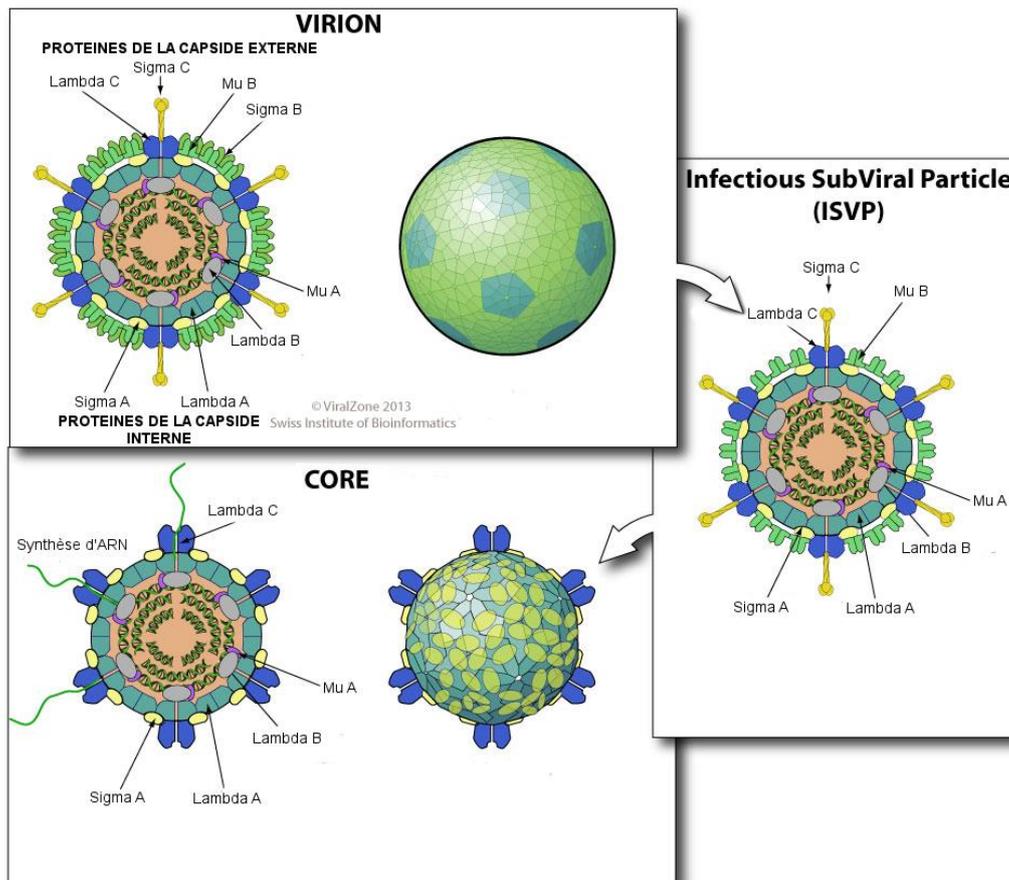


Figure 4 : Maturation des orthoréovirus (ViralZone 2013)

A noter que les virions produits à partir de ces particules parentales seront également dépourvus de capsid externe (Labrada et al., 2002) .

1.4.3 Expression génétique

Une fois le virus entré dans la cellule, l'étape suivante est l'expression du génome viral.

La première phase est la transcription du génome en ARN messagers (ARNm). Elle est réalisée par une enzyme, l'ARN polymérase ARNdb-dépendante.

10 ARNm sont ainsi formés à partir des 10 portions de génome ARN double-brin des réovirus (évoqués précédemment). C'est le brin d'ARN négatif (ou antisens) qui est transcrit et utilisé comme modèle pour la création des ARNm.

L'activité de transcription semble être reliée à la partie centrale du réovirion (le cœur ou « core »). En effet, des particules produites à partir de réovirus purifiés, ne comportant que le core du virus et des ISVP, peuvent synthétiser les 10 ARNm.

En revanche, des particules complètes possèdent une activité de transcription réduite *in vitro*, à savoir qu'elles ne peuvent pas produire la totalité des ARNm.

Cela prouverait que la modification physique du virion est nécessaire à l'activité optimale de l'ARN polymérase.

On suppose que les ARNm viraux sont synthétisés au centre de la particule virale et acquièrent leur coiffe (au niveau de leur extrémité 5') lors du passage par les tourelles du virion. C'est ici que λC , la protéine correspondant à l'enzyme coiffante, agirait.

La plupart des portions du génome des réovirus aviaire sont dites monocistroniques, c'est-à-dire qu'une portion permet la formation d'une protéine. Seule la partie S1 est polycistronique : 3 protéines sont traduites à partir de ce fragment (pour rappel : σC , p10 et p17).

La synthèse des polypeptides viraux se fait dans les premiers stades de l'infection et, après un certain laps de temps, la plupart des protéines fabriquées au sein de la cellule infectée sont d'origine virale. C'est la protéine p17 qui permettrait de limiter l'expression des protéines cellulaires au profit des protéines virales. A noter que certaines protéines virales semblent être produites en plus grande quantité que d'autre, ce qui sous-entendrait une régulation de l'expression génétique virale, sûrement au niveau traductionnel.

Les ARNm, qui sont des ARN simple-brin, vont ensuite servir à la synthèse du génome de la descendance virale. On suppose, par analogie avec les autres réovirus, que chaque brin d'ARN correspondant à un segment de génome est encapsidé et qu'une ARN polymérase fabrique ensuite le brin complémentaire pour conduire à la formation du génome virale à ARNdb. C'est la protéine λB qui serait impliquée dans ce mécanisme.

1.4.4 Morphogénèse et sortie de la cellule

La morphogénèse des particules virales va faire entrer en jeu des structures particulières : les inclusions cytoplasmiques.

Également appelées « usines virales » ou « viroplasmes », ces structures ont été évoquées précédemment dans le rôle de la protéine μ NS (cette dernière est en effet capable d'induire la formation d'inclusions virales seule).

Lors d'infection par les orthoréovirus aviaires, les inclusions sont observées dans la zone périnucléaire. Elles sont globulaires, ne possèdent ni membrane ni organites cellulaires et contiennent des protéines virales structurales comme non-structurales. Des particules virales à différent niveau d'assemblage sont également présentes.

Des études récentes ont, de plus, montré une différence majeure entre les inclusions virales aviaires et mammaliennes : les premières ne sont pas associées au réseau de microtubules (Tourís-Otero et al., 2004).

La protéine μ NS recrute d'abord les protéines σ NS et λ A, puis les autres protéines virales sont attirées dans les inclusions par des mécanismes encore indéterminés.

L'assemblage des particules virales, qui a lieu exclusivement dans les viroplasmes, est un phénomène réglé temporellement. Une fois les protéines synthétisées, le core viral est assemblé dans les 30 minutes et la capsid externe est ajoutée dans les 30 minutes suivantes.

La sortie et la propagation du virus est ensuite permis par le phénomène d'apoptose induite par les virions parentaux. Ce mécanisme est détaillé dans la suite de l'étude.

1.5 Modifications cellulaires induites par l'infection virale

1.5.1 Apoptose

Les réovirus aviaires, comme beaucoup d'autres virus, déclenchent le mécanisme d'apoptose de la cellule lors de l'infection (Labrada et al., 2002).

Plusieurs éléments semblent indiquer que l'induction de l'apoptose se déroule dans les premiers stades de l'infection :

- Des signes d'apoptose sont présents dans les premiers temps suivant l'infection

- Lorsque l'on ajoute des agents lysosomotropes (agents qui entraînent un dysfonctionnement des lysosomes) en début d'infection, ils permettent le blocage de la décapsidation et de l'apoptose induite par le virus.

Quand on les ajoute 3 heures plus tard, ils n'ont plus d'effet anti-apoptotique.

- L'apoptose est toujours déclenchée quand l'expression des gènes viraux est inhibée, ce qui signifierait que cette expression, tout comme les ARNm et les protéines non-structurales, n'aurait pas d'implication dans l'induction de l'apoptose.

L'induction de l'apoptose n'est pas liée à l'expression du génome viral : elle est donc déclenchée par les virions parentaux avant l'étape de transcription.

Cette induction est de plus inhibée lors d'ajout d'agents empêchant la décapsidation. La modification physique du réovirus dans l'endosome semble donc essentielle à l'initiation de l'apoptose.

La combinaison de ces deux phénomènes signifierait que ce sont les produits de protéolyse des virions parentaux dans l'endosome qui seraient responsables de l'apoptose.

De plus, bien que l'apoptose soit déclenchée dans les premiers stades de l'infection, elle n'est pas délétère à l'expression du génome et à la production d'une descendance virale conséquente. Il est donc supposé que le cycle de réplication court des réovirus permet d'obtenir une quantité satisfaisante de particules virales dans la cellule infectée avant que celle-ci ne meure.

Enfin, une étude a pu mettre en évidence le fait que l'apoptose permettait d'optimiser la dissémination et la réplication du virus. Le mécanisme impliquerait des protéines de type caspases (entrant en jeu dans l'apoptose) qui stimulerait le clivage de μ NS.

Le rôle des produits de clivage de μ NS reste cependant flou (Rodríguez-Grille et al., 2014) .

1.5.2 Fusion cellule-cellule

Peu de virus non-enveloppés provoquent la fusion des cellules de l'hôte qu'ils infectent. C'est le cas des réovirus aviaires, mais également des réovirus associés aux babouins, aux reptiles, de Nelson Bay et des aquarévirus (Shmulevitz et al., 2004)

Cette fusion entre cellule n'est apparemment pas essentielle à la réplication du virus, son inhibition ne provoquant pas de baisse significative de la production de descendance virale. Elle jouerait cependant un rôle dans la dissémination du virus, l'infection pouvant se propager de cellule en cellule en évitant le système immunitaire. Les cellules fusionnées constituent ce qu'on appelle un syncytium, correspondant à une masse de cytoplasme comportant plusieurs noyaux. Le signal initiant la formation de ce syncytium est émis par le virus lorsqu'il est à l'intérieur de la cellule. Ce serait donc la synthèse d'un produit viral intra-cellulaire qui amorcerait la fusion et non pas la pénétration du virus.

Selon certaines études, la capacité de former des syncytia serait relié au gène S1, et plus particulièrement à la protéine non-structurale p10.

Les protéines des réovirus impliquées dans la fusion des cellules possèdent des particularités structurales, une petite taille et une singularité par rapport aux autres protéines du genre.

Elles ont donc été regroupées sous le terme de protéines FAST (*Fusion-Associated Small Transmembrane*, ce sont donc de petites protéines transmembranaires permettant la fusion des cellules)

Ces protéines n'étant pas des protéines de structure, elles sont produites une fois le virus entré dans la cellule. Elles ne sont donc pas liées à la pénétration du virus au sein de la cellule infectée.

Il a également été montré que les protéines FAST entraînent la mise en place de l'apoptose et d'une déstabilisation membranaire dans les premiers temps suivant la formation du syncytium.

Ce phénomène permettrait la dissémination rapide de la descendance virale après transmission entre les cellules fusionnées (Read et al. 2015; Salsman et al. 2005) .

1.5.3 Perméabilisation de la membrane

Les virus cytolitiques tels que les réovirus ont en général la capacité d'augmenter la perméabilité membranaire.

Ce changement de perméabilité peut s'effectuer au moment de l'entrée du virus dans la cellule ou dans les premiers temps de l'expression du génome viral.

Dans le premier cas, l'augmentation de perméabilité permet le passage de molécules de petite comme de grande taille avec les particules virales. Les modifications structurales et fonctionnelles sont alors réversibles.

Dans l'autre éventualité, la modification membranaire est conduite par des viroporines, des protéines virales particulières qui permettent d'accroître le passage des ions et molécules de petites tailles mais pas des macromolécules.

Bodelon et al (2002) ont prouvé que la perméabilisation de la membrane de cellules CEF (cellules primaires de fibroblastes d'embryon de poulets) infectées par un réovirus aviaire était augmentée dans les stades tardifs de l'infection (deuxième cas de figure).

De plus, cette perméabilité accrue de la membrane était associée à une synthèse protéique virale ainsi qu'à une activité d'exocytose. Il a donc été déduit que c'était une protéine virale associée à la membrane cellulaire qui était impliquée.

Les 3 protéines produites à partir du gène S1 (σ C, p10 et p17) répondant à ce critère, elles ont été étudiées plus en détail. Finalement, seule p10 semble posséder cette capacité d'augmentation de la perméabilité membranaire et pourrait donc être considérée comme une viroporine.

p10 posséderait donc 2 caractéristiques : celle de permettre la fusion cellulaire et celle d'augmenter la perméabilité membranaire.

A noter que ces deux fonctions semblent bien distinctes au niveau de la protéine puisque une p10 modifiée (réduite au niveau de son extrémité N-terminale) possédait seulement la capacité de perméabiliser la membrane et perdait sa capacité de fusion.

1.5.4 Résistance à l'interféron

L'interféron (IFN) appartient à la famille des cytokines, des molécules sécrétées par différentes cellules (notamment du système immunitaire) pour permettre la signalisation inter-cellulaire.

Il se lie à des récepteurs cellulaires membranaires et permet de stimuler la synthèse d'une trentaine de protéines dont certaines jugulent les infections virales.

Parmi ces protéines, on retrouve notamment la protéine kinase PKR activée par l'ARNdb et la 2,5A synthétase qui ont été décrites comme inhibitrices de la synthèse protéique virale. L'action combinée de ces deux enzymes permet une réduction de l'activité de traduction et au final une inhibition de la production de protéines intra-cellulaire.

Il a été prouvé que les réovirus aviaires possèdent un mécanisme de résistance à l'interféron sécrété par les poulets (Chicken Interferon, chIFN).

En effet, l'addition d'interféron modifié de poulet à des CEF permettait d'obtenir une forte activité antivirale vis-à-vis du virus de la stomatite vésiculaire et de *Vaccinia virus* mais ne réduisait pas la réplication des réovirus S1133 (MARTINEZ-COSTAS et al., 2000) .

La résistance à l'interféron serait permise par la protéine σA qui empêcherait les deux enzymes citées précédemment (PKR et 2,5A synthétase) d'agir sur le virus.

Une étude plus récente (Lostalé-Seijo et al., 2016) a également démontré un autre phénomène qui semblerait, à première vue, en contradiction avec la résistance à l'interféron. En effet, d'après cette étude, l'infection par les orthoréovirus aviaires induirait la sécrétion d'interféron. Plus précisément, les résultats de l'équipe de Lostalé-Seijo vont dans le sens d'une stimulation de l'interféron ayant lieu dans les premiers stades de l'infection, à l'instar du mécanisme d'induction de l'apoptose.

Paradoxalement, il y aurait donc à la fois une stimulation et une inhibition de la production de chIFN. Deux hypothèses sont avancées pour expliquer ce phénomène :

- Soit la synthèse de PKR (activée par l'IFN) serait inhibée uniquement en périphérie des inclusions virales par σA et stimulée dans le reste du cytosol. Ainsi, la synthèse protéique virale serait pleinement exprimée et l'action de la PKR serait détournée vers la synthèse protéique cellulaire. Ce phénomène a été décrit chez les réovirus des mammifères.
- Soit la protéine σA inhiberait partiellement l'activation de PKR. Cette dernière exercerait alors son action inhibitrice principalement sur les ARNm cellulaires et pas viraux.

Chez les mammifères, une expression pro-virale de la PKR a été observée.

2. La réovirose aviaire

2.1 Généralités

Les réovirus aviaires étant ubiquitaires, la probabilité pour qu'un troupeau de volaille soit infecté au cours de sa vie est importante.

La plupart des souches isolées sont non-pathogènes (on estime cette proportion à 80% des souches (Van Der Heide, 1977)). On retrouve donc fréquemment le virus chez des animaux cliniquement sains.

Les réovirus aviaires sont impliqués dans de nombreuses maladies. Le lien entre la présence du virus et l'apparition de signes cliniques n'est cependant pas établi dans la plupart des cas.

Les arthrites virales ou ténosynovites font exception, l'implication des ARV dans ces problématiques n'étant plus à démontrer.

Ces virus sont également responsables du syndrome de malabsorption/retard de croissance en association avec d'autres agents étiologiques (Adenovirus, Parvovirus...)

On retrouve aussi d'autres affections impliquant possiblement les orthoréovirus chez le poulet :

- Affections respiratoires
- Hépatite à inclusion
- Mort subite associée à diverses lésions (cardiaques, rénal et hépatiques)

La sévérité et le type de maladie engendrés par l'infection à réovirus dépend de l'âge de l'hôte, de son statut immunitaire, ainsi que du pathotype et de la voie d'entrée du virus.

La co-infection avec d'autres agents pathogènes peut constituer également un facteur de variation.

La réovirose peut être responsable de pertes économiques importantes, notamment dans les élevages de poulets de chair.

Ces pertes sont dues à l'augmentation de la mortalité, aux arthrites virales/ténosynovites et aux baisses de performance globales (Gain Moyen Quotidien (GMQ) diminué, augmentation de

l'Indice de Consommation (IC), croissance irrégulière, dévalorisation des carcasses à l'abattoir).

Au niveau des troupeaux de reproducteurs, les coûts engendrés par un épisode d'arthrite virale à réovirus avant ou pendant la ponte peuvent être considérables. On pourra observer des boiteries, une chute de ponte, une dégradation de l'éclosabilité, de la fertilité et surtout, une transmission du virus à la descendance, souvent en l'absence de tout signe clinique (Jones, 2000).

2.2 Les arthrites et ténosynovites virales

Les arthrites virales touchent principalement les poulets de chair et constituent une des causes majeures de boiteries. On les identifie principalement sur des souches lourdes de *Gallus* (type Label) mais on en retrouve également sur des souches plus légères (poulets standards).

Quelques cas ont également impliqué des poules pondeuses (De Gussem et al., 2010)

2.2.1 Historique

L'équipe de Fahey et Crawley isola en 1954 un virus du tractus respiratoire de poulets atteint de maladie respiratoire chronique. Ce virus de Fahey-Crawley, une fois réadministré à des congénères sains, entraînait l'apparition de signes respiratoires chroniques, d'une nécrose hépatique, d'une tendinite et d'une inflammation de la membrane synoviale.

Des études suivantes dans les années 60 permirent d'isoler un agent à partir de synovites de poulets. Ce pathogène n'était pas sensible à la chlortetracycline et était sérologiquement différent de *Mycoplasma synoviae* et *Mycoplasma gallisepticum*.

Il fut nommé « agent de l'arthrite virale » et sera identifié plus tard comme appartenant possiblement aux réovirus (Walker, 1972).

Entre temps, Petek et al prouvèrent en 1967 que le virus de Fahey-Crawley était effectivement un réovirus.

Le terme de « ténosynovite » (qui est actuellement employé comme synonyme d'arthrite virale) sera utilisé par Dalton et Henry la même année. Il évoque les lésions observées au niveau des tendons et de la gaine tendineuse, lésions qui diffèrent de celles observées habituellement en cas de mycoplasmoses à *Mycoplasma synoviae*.

Les années suivantes, Olson et al. identifièrent ces mêmes lésions sur des poulets de chair indemnes de *M. synoviae*. Ils montrèrent que le virus isolé possédait des similarités antigéniques avec l'agent de Fahey-Crawley et les mêmes caractéristiques que l'agent de l'arthrite virale.

Depuis l'établissement de ce lien entre réovirus et ténosynovite aux Etats-Unis et en Grande-Bretagne, la maladie a été décrite dans de nombreux autres pays, comme en témoignent les revues publiées vers les années 80 (Van Der Heide, 1977) .

Face à cette montée de nombreux cas partout dans le monde, des mesures de contrôle ont dû être mises en place. Ce sont les connaissances acquises sur la transmission d'anticorps protecteurs des reproducteurs à la descendance qui ont permis le contrôle de la réovirose (van der Heide et al., 1976) .

Des vaccins vivants et inactivés ont alors été développés pour protéger les reproducteurs et leur permettre de transmettre leurs anticorps à la descendance (voie transovarienne).

Le premier vaccin vivant commercial a été élaboré à partir de la souche S1133 en 1980 (van der Heide, Page, 1980).

La souche S1133 est depuis devenue la principale souche vaccinale et de nombreux vaccins ont été créés, inactivés avec cette souche seule ou en association avec d'autres souches.

2.2.2 Pathogénèse et épidémiologie

2.2.2.1 Hôte

Les réovirus aviaires ont été isolés chez de nombreuses espèces avicoles mais c'est seulement chez le poulet de chair qu'un lien a été établi entre l'infection par des réovirus et le développement de ténosynovites (naturellement et expérimentalement).

Cependant, concernant la dinde, comme évoqué précédemment, de nombreuses études prouvent que des réovirus particuliers (TARV pour *Turkey Arthritis Réovirus*) sont responsables d'arthrites.

Les premières investigations sur ce sujet datent des années 1980, des épisodes de ténosynovites sur des dindes sont associés à la présence d'un réovirus au niveau des tendons (Levisohn et al., 1980).

Par la suite, Fletcher et al isolèrent à nouveau en 1982 un virus sur des dindes présentant des ténosynovites. Ils remarquèrent qu'en administrant ce virus au niveau du coussinet plantaire de dindonneaux d'un jour, ces derniers développaient une ténosynovite à leur tour.

Cependant, Al Afaleq et Jones arrivèrent à la conclusion inverse en 1989, les réovirus obtenus à partir de cas de ténosynovite ne permettant pas de recréer des ténosynovites une fois inoculés à des poussins d'un jour (AL Afaleq, Jones, 1989) .

Il faudra attendre une vingtaine d'années pour voir des avancées sur le sujet (Mor et al., 2013) :

5 souches de TARV furent isolées et caractérisées génétiquement à partir de différents cas de ténosynovites de dindes. Ces souches présentaient environ 90% de similarité avec le TERV (Turkey enteritic réovirus) mais seulement 78% avec une souche de réovirus causant des ténosynovites chez le poulet (CARV).

Récemment, des investigations supplémentaires ont montré que les TARV avait bien la capacité d'engendrer des ténosynovites significativement plus sévères que les TERV ou les CARV, prouvant un peu plus la spécificité de ces souches. Il y avait également une différence de sévérité entre différentes souches de TARV(Sharafeldin et al., 2014) .

Enfin, les TARV ne créent *a priori* pas de ténosynovites cliniques chez le poulet à 3 semaines post-infection lorsque le virus est administré par voies orale et intratrachéale, qui sont les voies d'entrée naturelles des réovirus (Sharafeldin et al., 2015) .

Bien que le lien entre réovirus et ténosynovites ne semble pas aussi bien établi que chez *Gallus*, les avancées récentes vont toutes dans le sens de l'existence de souches spécifiques génératrices d'arthrites chez la dinde.

A noter également que de nombreuses espèces d'oiseaux non-domestiques peuvent être infectés par des réovirus (Styś-Fijoł et al., 2017).

2.2.2.2 Résistance à la maladie selon l'âge d'infection

On remarque que la maladie est facilement reproductible sur des poussins d'un jour.

Les animaux peuvent également être infectés à un âge plus avancé mais la sévérité de l'atteinte est moindre. Tout cela est logiquement lié à la capacité des individus à développer une réponse immunitaire lors de l'infection par le virus. Les jeunes animaux ayant un système immunitaire moins performant, le virus peut s'exprimer plus librement. Cette tendance n'est cependant pas absolue, des individus âgés pouvant présenter une immunodépression et donc une réovirose sévère.

La période d'infection engendrant les lésions les plus sévères par la suite semble se situer avant 6-9 semaines (Jones, Georgiou, 1984).

2.2.2.3 Transmission

Il y a deux voies de transmissions possibles pour les réovirus aviaires : la voie horizontale et la voie verticale.

Voie horizontale

Elle correspond à la transmission du virus au sein du troupeau et entre les animaux. Ce moyen de dissémination du virus est connu depuis le début des années 80, de nombreuses études l'ayant démontré.

Les oiseaux malades et infectés représentent alors la principale source d'infection. Le milieu extérieur est également un réservoir important, étant donné que les réovirus sont très résistants de par leur caractère non-enveloppé.

Suite à l'infection, le virus va d'abord se répliquer au niveau de l'épithélium intestinal et de la bourse de Fabricius (entre 2 et 12 heures après exposition au réovirus). S'en suit une dissémination dans de nombreux tissus dont l'articulation tibio-métatarsienne dans les 24 à 48 heures post-infection.

Le virus va persister pendant au moins 10 jours dans le tube digestif et l'appareil respiratoire. C'est l'excrétion intestinale qui semble persister le plus longtemps, ce serait donc la voie de contamination fécal-oral qui primerait dans le mode de transmission horizontal.

L'agent semble également persister longtemps au niveau des articulations touchées et des amygdales caecales, les oiseaux porteurs du virus peuvent alors également constituer une source de contamination importante (van der Heide, 2000 ; Jones, Georgiou, 1984).

On peut noter également que les jeunes individus infectés par voie respiratoire semblent plus sensibles au virus que ceux infectés par voie orale (Roessler, Rosenberger, 1989) .

Voie verticale

On entend par « voie verticale » la transmission *in ovo* du virus de la mère à la descendance.

Tout comme pour la voie horizontale, l'existence de ce mode de transmission n'est plus à démontrer.

En effet, suite à l'infection de troupeaux de reproducteurs par des réovirus, ces derniers sont isolés dans les œufs pondus 5 à 19 jours post-infection. On retrouve également le virus dans le foie, les intestins et les articulations tarsométatarsiennes des poussins issus de ces œufs. Paradoxalement, même si l'on retrouve du virus au niveau des œufs infectés, ce n'est pas le cas au niveau d'écouvillons cloaquaux réalisés sur les poules reproductrices dont sont issues les œufs en question (Al-Muffarej et al., 1996 ; Menendez et al., 1975) .

La possibilité d'entrée du virus par des lésions cutanées (au niveau du coussinet plantaire) a également été mise en évidence avec une souche de réovirus sensible à la trypsine.

2.2.2.4 Période d'incubation

La durée de la période d'incubation du virus dépend de plusieurs facteurs : pathogénicité de la souche, âge de l'hôte infecté et voie d'entrée du virus.

Le Tableau 3 reprend les périodes d'incubation observées chez des poulets de 2 semaines infectés par différentes voies.

Voie d'inoculation	Période d'incubation
Coussinet plantaire	1 jour
Intramusculaire Intraveineuse Intrasinusale	11 jours
Intratrachéale	9 jours
Contact	13 jours

Tableau 3 : Périodes d'incubation d'un réovirus aviaire chez un poulet de 2 semaines en fonction de la voie d'infection (d'après Jones, 2013)

Bien que les jeunes poussins soient les plus vulnérables à l'infection par les réovirus, le développement de lésions articulaires est un phénomène lent.

Ainsi, s'il y'a des signes de boiteries, ils apparaîtront plutôt à partir de 4-7 semaines d'âge, même si les individus sont censés être plus résistants dans cette tranche d'âge.

A noter que le virus peut persister dans les tendons pendant au moins 22 semaines.

Concernant les lésions d'arthrite virale chez les dindes, ce sont essentiellement les mâles qui sont touchés à partir de 14 semaines. Une résistance augmentant avec l'âge, comme on l'observe chez le genre *Gallus* est encore à démontrer (Jones, 2013).

2.2.3 Signes cliniques observés lors d'arthrite virale

Chez les poulets de chair, les plus concernés par le phénomène d'arthrite virale, le signe le plus couramment observé est la boiterie. Même si l'infection peut arriver très tôt dans la vie de l'animal (lors de transmission verticale notamment), les signes de boiteries ne sont observés que vers 4-5 semaines d'âge.

L'atteinte peut être uni- ou bilatérale et va se situer le plus souvent au niveau de l'articulation tarsométatarsienne.

Les sujets présentant un gonflement bilatéral des tendons vont souvent être retrouvés près des points d'eau, couchés sur leurs tarso-métatarses (voir Figure 5 ci-dessous).



Figure 5 : Posture anormale chez un poulet Label Rouge atteint d'arthrite virale (Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse)

Dans le cas d'affection aiguë, un retard de croissance pourra également être observé chez les sujets cliniques.

L'arthrite virale à réovirus est une maladie qui cause généralement une faible mortalité (autour de 5%).

Les animaux atteints étant plus faibles et moins mobiles, ils meurent généralement par piétinement. Si la mortalité est d'ordinaire faible, la morbidité est par contre souvent élevée, pouvant même atteindre 100% du troupeau. Comme on l'a évoqué précédemment, c'est cette morbidité élevée qui engendre des pertes économiques considérables (Jones, 2013).

L'atteinte tendineuse peut aller jusqu'à la rupture du tendon gastrocnémien. Ce phénomène est particulièrement retrouvé chez les animaux lourds (coqs reproducteurs de 12 à 16 semaines, dindes de 5 à 8 semaines).

Les oiseaux sont alors incapables de mobiliser leurs tarso-métatarses, ce qui conduit à une démarche modifiée et parfois une rupture des vaisseaux sanguins associés à l'articulation touchée.

Chez la dinde, des études récentes en Amérique du Nord ont montré qu'on observait également des boiteries et des articulations tibio-métatarsienne gonflées chez des dindons de 14 semaines. La mortalité était de 2 à 30% selon les cas en incluant les animaux malades ayant été éliminés. La morbidité se situait entre 5 et 7%.

Chez la poule pondeuse, on observe un tableau clinique moins sévère, les sujets malades étant réformés rapidement.

2.2.4 Lésions macroscopiques

Le gonflement des tendons concerne le plus fréquemment les tendons gastrocnémiens, fléchisseurs des doigts et extenseurs des métatarses.

Concernant ces premiers, une palpation au-dessus de l'articulation tibio-métatarsienne permet de repérer aisément un éventuel gonflement. L'articulation est chaude.

On peut également observer une coloration verdâtre de la peau. Elle est liée à l'hémorragie créée par la rupture tendineuse. En effet, suite à la rupture des vaisseaux, le sang prend une couleur verte par la présence de biliverdine (produit de dégradation intermédiaire de l'hème).

Cette coloration est importante car elle peut constituer un motif de dégradation de carcasse important à l'abattoir et donc une perte économique non négligeable.



**Figure 6 : 1) A gauche : Gonflement unilatéral du tendon gastrocnémien chez un poulet Label (ENVV)
2) A droite : Rupture du tendon fléchisseur des doigts chez un poulet standard de 32 jours (Sellers 2017)**

Le gonflement peut également se situer en dessous de l'articulation tibio-métatarsienne, l'inflammation toucherait alors plutôt le tendon fléchisseur des doigts. En réalité, lorsque l'on autopsie des sujets présentant ce type de gonflement, on remarque souvent que le gonflement est lié à la rupture du tendon fléchisseur au niveau de l'articulation tibio-métatarsienne et que ce dernier a subi une inflexion sigmoïde.

Il est en outre possible de visualiser un léger exsudat couleur paille et/ou teinté de sang voire un exsudat abondant et purulent, ce dernier rappelant un tableau clinique d'arthrite à *Mycoplasma synoviae*.

Les gaines tendineuses sont également affectées, elles auront le plus souvent un aspect œdématisé, gélatineux. Lorsque la maladie devient chronique, les gaines tendineuses fusionnent et durcissent (Jones, 2013)

Des pétéchies peuvent également être présentes au niveau de la membrane synoviale de l'articulation du jarret.

Enfin, l'impact à long terme peut également concerner les cartilages articulaires avec une érosion suivi d'une fibrose.

On observera globalement les mêmes lésions chez la dinde.

2.2.5 Modifications histologiques

Phase aiguë (1 à 2 semaines post-infection)

On observe de l'œdème, une nécrose ischémique, une accumulation hétérophilique et une infiltration périvasculaire. Une hyperplasie et hypertrophie des cellules synoviales est également présente ainsi qu'une infiltration lymphocytaire et macrophagique. Des réticulocytes sont souvent présents en nombre important. Les couches viscérales et pariétales de la gaine tendineuse sont alors épaissies.

Dans la cavité synoviale, on retrouve à la fois des hétérophiles, des macrophages et des débris de cellules synoviales.

Phase chronique (à partir de 15 jours post-infection)

L'accumulation de réticulocytes commence à former des nodules lymphoïdes. A partir de 30 jours suivant l'infection, du tissu conjonctif fibreux se met en place. L'infiltration et la prolifération des réticulocytes, lymphocytes, macrophages et plasmocytes continue d'augmenter.

Ces caractéristiques histologiques sont visibles sur la Figure 7 ci-dessous.

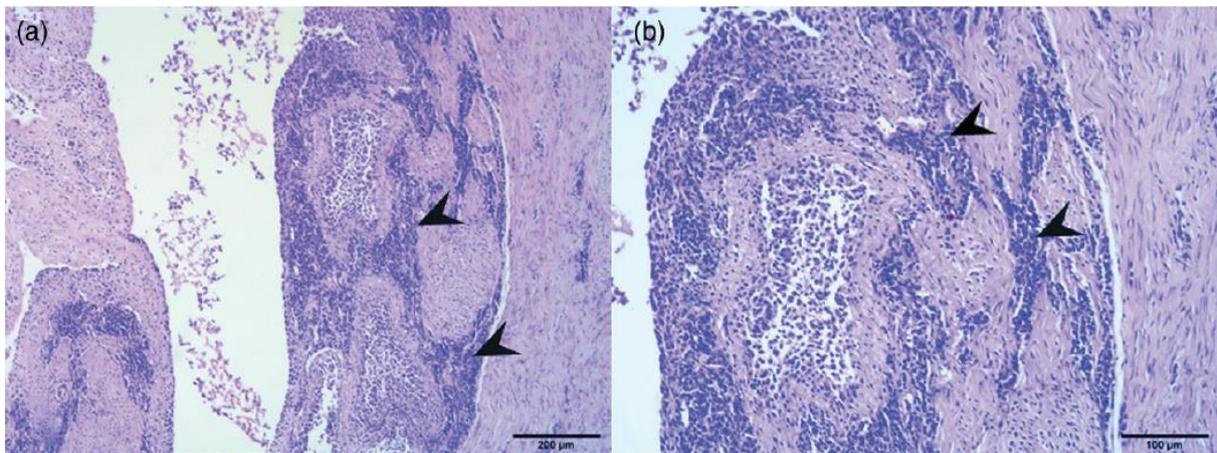


Figure 7 : Coupe histologique de tendon dans un cas d'arthrite virale (coloration Hémalun-Eosine). Une accumulation multifocale lymphocytaire et plasmocytaire est présente (flèches noires). La cavité synoviale est remplie de débris cellulaires et l'épithélium se détache (Troxlér et al, 2013)

Toutes ces modifications se retrouvent également au niveau de l'articulation tibio-métatarsienne et au niveau du tarso-métatarsaire.

Le tendon est parfois complètement remplacé par du tissu de granulation. La fibrose chronique qui envahit les gaines tendineuses conduit à une ankylose et immobilité des tendons.

L'évolution de l'ultrastructure du tendon gastrocnémien a également été étudiée. Les modifications tendineuses ont ainsi été observées sur des poussins infectés à 1 jour d'âge. Il en ressort qu'au fur et à mesure de l'infection, les fibroblastes des tendons subissent une dégénérescence avec notamment une vacuolisation cytoplasmique, une perturbation membranaire et mitochondriale ainsi qu'une perte des ribosomes du réticulum endoplasmique (Hill, Rowland, Steffens, et al., 1989) .

On retrouve aussi les lésions cartilagineuses évoquées précédemment avec une érosion du cartilage de l'articulation tibio-métatarsienne conduisant à une ostéogénèse (activation des ostéoblastes).

Des modifications sont quelquefois retrouvées au niveau du myocarde, avec une infiltration hétérophilique entre les fibres musculaires cardiaques. Cette infiltration n'est toutefois pas démontrée comme pathognomonique de la réovirose aviaire. Enfin, l'induction d'une nécrose hépatique a également été décrite (Jones, Guneratne, 1984)

2.2.6 Réponse immunitaire à l'infection

2.2.6.1 Réponse humorale

La réponse immunitaire humorale constitue le moyen de protection principal de l'organisme infecté par les réovirus.

Il existe deux types d'antigènes conduisant à des réactions anticorps/antigènes différentes.

Le premier est un antigène spécifique du groupe des réovirus, qui regroupe l'ensemble des réovirus. On titre les anticorps dirigés contre ces antigènes par des méthodes de diffusion et précipitation sur gel d'agarose. Ce sont des anticorps précipitants.

Il existe également des antigènes associés à un sérotype particulier de réovirus. Ils conduisent à la formation d'anticorps neutralisants qui sont dosés par des tests de séroneutralisation par réduction des plages de lyse (Robertson, Wilcox, 1984).

C'est la protéine σ C qui va entraîner la formation d'anticorps neutralisants spécifiques des réovirus. Cette protéine a également permis de stimuler la réponse immunitaire mucoale en association avec un vecteur bactérien (Lin et al., 2012 ; Goldenberg et al., 2011).

Ces anticorps neutralisants sont détectés à partir d'environ 7 à 10 jours post-infection, plus tôt que les anticorps précipitants, qui sont eux obtenus 2 semaines après l'infection.

Ils semblent également persister plus longtemps, ce phénomène pouvant cependant être lié à la sensibilité des tests employés.

Le rôle protecteur des anticorps circulants n'est pas bien défini. En effet, expérimentalement, des poulets restent infectés de manière persistante malgré des titres en anticorps circulants élevés.

La protection apportée aux poussins d'1 jour par les anticorps d'origine maternelle est en revanche mieux établie.

Les anticorps circulants limitent l'expression du potentiel viral en empêchant le passage du virus du tube digestif vers les articulations. Ils agiraient en empêchant le virus de se lier à la cellule cible, en facilitant la lyse de la particule virale ou la liaison du complément à la cellule ou en contribuant à la phagocytose/cytolyse (van Loon et al., 2003 ; Herdt et al., 1999).

L'efficacité de la protection par les anticorps dépend de différents facteurs tels que le sérotype, la virulence de la souche, l'âge de l'hôte ou encore le titre en anticorps (Takase et al., 1996 ; Meanger et al., 1997 ; Rau et al., 1980) .

2.2.6.2 Immunité mucoale

Cette réponse immunitaire peut jouer un rôle important pour stopper la dissémination du virus.

Elle est permise par des IgA intestinales et dépend de l'âge, la voie d'infection et la sensibilité à la trypsine de la souche de réovirus infectante. Chez des poussins infectés à 1 jour d'âge et/ou infectés oralement par une souche sensible à la trypsine, les IgA intestinales ne sont pas détectées. (Mukiibi-Muka, Jones, 1999)

2.2.6.3 Réponse cellulaire

L'implication des lymphocytes B et T dans la protection contre la réovirose a été étudiée. Il en ressort que les deux types cellulaires semblent être acteurs dans la rémission de l'animal infecté. La protection contre le virus serait en revanche l'apanage des lymphocytes B (Kibenge et al., 1987) .

L'administration de cyclosporine A, affectant les lymphocytes T, a pour effet d'augmenter la mortalité chez des poulets atteints de réovirose. Ce traitement n'avait en revanche pas d'impact sur les lésions tendineuses (Hill, Rowland, Latimer, et al., 1989) .

Pertile et al. ont également étudié la réponse cellulaire au niveau d'arthrite à réovirus chez des poulets. Ils ont pu établir le type de population cellulaire présente au niveau des articulations des sujets atteints. Les lymphocytes T et les plasmocytes (lymphocyte B matures) sont ainsi les 2 principaux types cellulaires retrouvés. Il y a une évolution en fonction des phases de la maladie :

- En phase aiguë : on retrouve essentiellement des lymphocyte T CD8+, c'est-à-dire des lymphocytes T cytotoxiques en faible quantité
- En phase subaiguë, l'activité cellulaire augmente avec une population composée de lymphocytes T CD4+ (lymphocytes T auxiliaires) et CD8+. On retrouve également des lymphocyte B IgM-positif (plutôt immature) et des plasmocytes.
- Lors de la phase chronique, ce sont les lymphocytes CD4+ qui sont présents en majorité.

Ces résultats indiquent que l'activation des macrophages suite à l'infection a pour effet de protéger la cellule contre les effets cytopathique et la réplication virale. Cette protection pourrait être liée à la sécrétion de monoxyde d'azote qui aurait un effet cytostatique sur les cellules de l'hôte.

Des investigations supplémentaires ont permis de montrer également que les réovirus aviaires n'altéreraient pas directement la fonction des lymphocytes T mais permettaient la formation de macrophages suppresseurs qui inhibent les lymphocytes T (Pertile et al., 1996) .

Une autre étude (van Loon et al., 2003) a utilisé des poussins possédant des anticorps maternels, ayant reçu de la cyclophosphamide (inhibitrice des lymphocytes B) et étant vaccinés à 7 jours avec une souche atténuée 2177. Un autre lot n'était pas vacciné à 7 jours. Les auteurs ont remarqué qu'ils ne détectaient pas de virus dans le lot vacciné contrairement au lot non vacciné. Ils en conclurent que l'immunité cellulaire était suffisante à protéger les poussins vaccinés à 7 jours et possédant des anticorps maternels.

2.3 Autres implications pathologiques des réovirus

2.3.1 Le syndrome de malabsorption

2.3.1.1 Agents étiologiques

Le syndrome de malabsorption (*Malabsorption syndrome* ou MAS en anglais) est un problème mondial, qui touche principalement les poulets de chair. Les pertes économiques engendrées par les retards de croissance, l'augmentation de la mortalité

Plusieurs noms sont employés pour désigner cette atteinte : syndrome de rabougrissement (ou RSS pour Runting-stunting syndrome), des ailes en hélicoptère, de l'oiseau pâle ou encore des os de verre...

Contrairement à l'arthrite virale, les réovirus ne sont pas clairement reliés à ce syndrome.

Ce serait plutôt un phénomène à étiologie multiple impliquant, outre les réovirus, des parvovirus, enterovirus, rotavirus, calicivirus, astrovirus... (Goodwin, Davis, Player 1993 ; Devaney et al. 2016 ; Decaesstecker, Charlier, Meulemans 1986 ; Kang et al. 2012).

Songserm et al ont de plus montré que les réovirus aviaires seuls n'induisait pas les lésions observées en cas de syndrome de malabsorption, bien qu'ils se répliquent au niveau intestinal. Cela confirme l'étiologie multiple de ce syndrome (Songserm et al., 2003) .

Des études vont pourtant dans le sens inverse en indiquant que certaines souches de réovirus ont la capacité d'induire des entérites plus ou moins sévères (Songserm et al., 2002 ; Rekik et al., 1991).

2.3.1.2 Manifestations cliniques

Les signes cliniques se manifestent essentiellement par des retards de croissance sévères et une forte hétérogénéité sur l'ensemble du lot touché. On retrouve des animaux avec un plumage ébouriffé (syndrome « hélicoptère »), des os fragiles ou déformés et une pâleur au niveau des crêtes (Rebel et al., 2006).

Le plumage ébouriffé peut s'expliquer par la synthèse anormale de plume du fait de la mauvaise absorption de nutriments. De la même manière, les os fragiles se retrouvent sur les oiseaux en retard de croissance qui ont alors de l'ostéoporose et des fractures de la tête fémorale.

La pâleur observée résulte de la mauvaise assimilation du carotène, on peut également retrouver un excès de pigment dans les fientes.

Le syndrome de litière humide a également été décrit et ferait partie du MAS, certains animaux pouvant présenter une diarrhée avec des aliments non digérés.

Le tableau clinique est varié et on peut retrouver d'autres signes comme des distensions abdominales, une mortalité précoce...

Les individus sont particulièrement sensibles dans les deux premières semaines de vie.

2.3.1.3 Lésions macroscopiques et microscopiques

Les sujets atteints présentent un intestin grêle pâle et distendue avec un contenu mucoïde.

Au niveau microscopique, les principales lésions résultent dans la formation de kystes dans les cryptes de Lieberkühn et une atrophie des villosités intestinales.

On peut également retrouver des lésions pancréatiques et proventriculaires mais elles restent rares.

D'un point de vue physiopathologique, on ne sait pas si les lésions intestinales engendrent une maldigestion (par insuffisance de sécrétions), une malabsorption (par pertes des capacités d'absorption de la muqueuse) ou les deux. La sévérité des lésions peut dépendre de nombreux facteurs : génétique des individus, âge, état de santé de la mère et du poussin d'un jour, alimentation, stress environnemental et problème technique.

2.3.2 Autres atteintes chez *Gallus gallus*

2.3.2.1 Maladies respiratoires

Historiquement, le virus Fahey-Crawley (déjà cité précédemment et considéré comme le premier réovirus isolé) provoquait une atteinte respiratoire chez les jeunes poussins infectés

mais pas chez les individus plus âgés. Quelques cas anecdotiques de maladie respiratoire en lien avec des réovirus furent rapportés par la suite, notamment en association avec *Mycoplasma gallisepticum*. Globalement, les réovirus ne sont pas considérés comme des agents primaires de maladies respiratoires.

2.3.2.2 Maladies entériques et infections systémiques

On retrouve dans la littérature quelques exemples d'entérites où un réovirus a été isolé.

Quelques cas ont ainsi été décrit à la fin des années 60, les individus présentant des cloaques souillés et de la mortalité (Dutta, Pomeroy, 1967)

Cependant, dans le cas de maladies entériques, les réovirus ne sont pas considérés comme seuls déclencheurs de la maladie mais plutôt comme agissant en association avec d'autres agents comme des Adénovirus par exemple (Lenz et al., 1998) .

De plus, d'autres publications décrivent un effet synergique entre les réovirus et d'autres agents pathogènes digestifs comme *Cryptosporidium baileyi* (Guy et al., 1988) ou des coccidies (Ruff, Rosenberger, 1985).

En 1972, des problèmes d'infections généralisées (hépatite, ascite, hydropéricarde, reins pâles) entraînant des mortalités soudaines chez des poulets de chair ont également été reliés aux réovirus. Là encore, le réovirus ne serait pas seul acteur de cette maladie et d'autres facteurs non identifiés rentreraient en jeu. (Jones, 2013)

Au final, peu de cas de maladies entériques ou d'infections systémiques semblent décrits actuellement dans la littérature.

2.3.2.3 Affections cardiaques

Plus anecdotiquement, des cas d'hydropéricardes et de forte mortalité chez des poulets de moins de 14 jours ont été associés à la présence d'un réovirus, sans l'impliquer clairement dans la maladie.

Jones retrouvera les mêmes lésions en 1976 et arrivera à reproduire les lésions cardiaques par injection intraveineuse du réovirus isolé à des individus SPF (Jones, 1976).

Le mécanisme induisant la formation d'hydropéricarde par les réovirus n'a cependant jamais été investigué (Jones, 2013) .

Il a également été rapporté des myocardites chez des poulets de chair reproducteurs à 9-11 jours (Davis et al., 2012). Dans ce cas précis, les sujets atteints présentaient également de l'ascite ainsi que de la nécrose et fibrose hépatique. Le réovirus typé était différent des souches décrites.

2.3.3 La réovirose chez d'autres espèces avicoles

2.3.3.1 Chez la dinde

Comme évoqué précédemment, les réovirus peuvent également être isolés en cas de ténosynovites chez la dinde.

Bien que le lien entre le virus et la maladie soit moins établie que chez le poulet, de nombreux cas ont été observés récemment, notamment aux Etats-Unis, avec une implication claire des réovirus (Mor et al., 2013 ; Sharafeldin et al., 2015) .

Le rôle des réovirus dans les maladies entériques semblent en revanche mieux déterminé que chez *Gallus gallus*. En effet, de nombreuses études ont montré l'implication des réovirus dans des complexes entéritiques, comme le PEMS (*Poult enteritis mortality syndrom* c'est-à-dire le syndrome entérique mortel du dindonneau) par exemple (Gershowitz, Wooley, 1973 ; Heggen-Peay, 2002 ; Mor et al., 2013).

2.3.3.2 Chez le canard et l'oie

La réovirose du canard de Barbarie est une maladie qui a d'abord été décrite en Afrique du Sud et en France.

Les symptômes touchent les jeunes canetons de 2 à 4 semaines d'âge et se traduisent par de la diarrhée, des difficultés à se déplacer, une forte morbidité et une mortalité élevée (10% voire plus). Le tableau lésionnel est caractérisé par des foyers de nécrose hépatique, splénique et rénale (Malkinson et al., 1981) .

Une publication de 2003 décrit également une infection à réovirus chez l'oie (Palya et al., 2003). Les individus atteints présentaient des foyers de nécrose miliaires spléniques dans la phase

aiguë de la maladie et des épocardites, arthrites et ténosynovites dans le cas de lésions plus chroniques. On peut également noter que les réovirus des canards (DRV) et de l'oie (GRV) sont bien distincts génétiquement des ARV (Zhang et al., 2006) .

3. Situation actuelle : émergence mondiale de nouveaux variants

3.1 De nombreux cas de réovirose décrits ces 20 dernières années

Comme on l'a vu précédemment, les réovirus aviaires ont été découverts dans les années 50 et les nombreuses publications qui ont suivi ont contribué à décrire ces virus dans les années 70.

Des vaccins ont ensuite été développés et ont permis de contrôler la maladie pendant plusieurs décennies (van der Heide et al., 1983).

Ce n'est que dans les années 2000 que les foyers d'infection à réovirus ont commencé à se multiplier. Ces maladies apparaissent en dépit de la vaccination des reproducteurs avec les souches vaccinales usuelles.

Des investigations ont alors permis de lier ce phénomène à l'apparition de nouveaux variants, échappant à la protection vaccinale.

Nous allons ici développer des exemples décrits dans la littérature ces dernières années afin d'illustrer cette émergence de nouvelles souches à l'échelle mondiale.

3.2 Le variant ERS

3.2.1 Découverte et isolement de la souche

En 2001 en Pologne, un fort taux de mortalité a été observé chez des poulets de chair. Les individus présentaient des difficultés à se déplacer et, après autopsie, des péricardites ainsi que des lésions focales de nécrose hépatique étaient observées (van Loon et al., 2001).

L'agent responsable a été isolé à partir de prélèvements d'organes (foie, rein, thymus, amygdales caecales, rate, intestins et cœur), qui ont été homogénéisés et mis en culture

cellulaire. Les plages de lyse formées dans le tapis cellulaire ont ensuite été purifiées et c'est à partir de ces plages purifiées que le virus a pu être isolé.

Après isolement, une technique d'immunofluorescence employant des anticorps polyclonaux de lapin a été mise en œuvre. Le virus a ainsi pu être identifié comme étant un réovirus. Cette souche de réovirus a été nommée ERS (pour « Enteric Réovirus Strain », ces souches étant impliquées dans des syndromes de malabsorption).

Ce qui est intéressant ici, c'est que ces cas ont également été rapportés dans des troupeaux dont les reproducteurs avaient été correctement vaccinés suivant un protocole classique.

3.2.2 Infection expérimentale d'individus SPF par la souche isolée

Une fois purifiée, la souche dénommée comme ERS-1 a été inoculée par voie orale à des poussins SPF d'un jour. La mortalité a alors atteint 100% dans les 7 jours suivant l'infection. Lorsque le virus était injecté à des poulets SPF de 3 semaines d'âge, la mortalité atteignait 53% par injection dans le coussinet plantaire et 12% par voie sous-cutanée. Un dernier test donnait comme résultat une mortalité de 12% chez des individus de 9 semaines inoculés par le coussinet plantaire.

On observe donc une résistance à l'infection qui s'accroît avec l'âge, caractéristique des réovirus déjà évoquée précédemment.

La mortalité reste cependant conséquente dénotant la virulence élevée de la souche isolée.

A noter que le virus a pu être réisolé dans de nombreux organes 3 et 7 jours après infection, voire 3 semaines post-infection dans le cas du pancréas.

L'impact du variant ERS sur le retard de croissance a également été évalué.

Les poids de 15 oiseaux infectés avec le variant et de 15 oiseaux non-infectés ont été comparés. A 7 semaines d'âge, les individus infectés oralement ou par voie sous-cutanée à l'âge d'un jour présentent un poids inférieur de 34% par rapport aux individus sains.

Les sujets inoculés à 1 semaine ont un retard de poids de 25%.

Cette nouvelle souche de réovirus est donc capable d'induire des retards de croissance important du fait de son implication dans le syndrome de malabsorption.

3.2.3 Des caractéristiques sérologiques différentes des souches connues

En utilisant un test de réduction des plages de lyse, l'équipe de Van Loon a pu se rendre compte que la souche ERS-1 isolée en Pologne présentait un profil réactionnel aux anticorps monoclonaux différents des autres souches de réovirus testées. En effet, pour réaliser ce test, des anticorps monoclonaux dirigés contre différentes souches vaccinales de réovirus décrites dans la littérature (1733, 2408, 2177) ont été utilisés pour neutraliser le variant ERS sur des cultures cellulaires.

Si les anticorps neutralisent le virus, son effet cytopathogène sera diminué et les plages de lyses seront réduites par rapport à une culture cellulaire où seul le virus est présent. Or, dans ce cas, les anticorps monoclonaux produit à partir des 3 souches de réovirus étaient incapables de réduire l'effet cytopathogène de l'ERS. On peut en déduire que les anticorps produits à partir de ces souches vaccinales ne permettent pas de neutraliser le variant ERS. Ce dernier constitue alors un nouveau sérotype.

3.2.4 Autres cas impliquant le variant ERS par la suite

Au moment de la découverte de ce nouveau sérotype, d'autres réovirus isolés dans des cas de malabsorption ont pu être rattaché aux ERS. Ils présentaient en effet le même profil sérologique que la première souche isolée en Pologne.

Une étude fut ensuite conduite en Belgique sur la période 2001-2006, elle concernait 21 élevages de poulets de chair.

Le variant ERS a été isolé dans les lots atteints à partir d'organes tels que le foie, le tendon gastrocnémien, la bourse de Fabricius et le pancréas.

Le tableau clinique était globalement le même dans l'ensemble des élevages étudiés. Il se caractérisait par des retards de croissance, une litière humide associée ou non à des boiteries.

Environ la moitié des élevages présentait une augmentation de mortalité.

Les lésions macroscopiques consistaient en des hépatites, des myocardites, des pancréatites, des proventriculites, des entérites et des ténosynovites du tendon gastrocnémien.

Les élevages présentant de la mortalité étaient souvent victimes d'une co-infection avec *Escherichia coli*, *Ornithobacterium rhinotracheale*, des Adénovirus ou le virus de la bronchite infectieuse. Là encore, ces épisodes sont survenus en dépit de la vaccination des reproducteurs avec des souches vaccinales classiques.

De manière plus anecdotique, le variant ERS peut être responsable de signes nerveux, engendrant des tremblements et torticolis après infection par voie intramusculaire ou orale (Van de Zande, Kuhn, 2007).

3.3 Réovirus émergents aux États-Unis

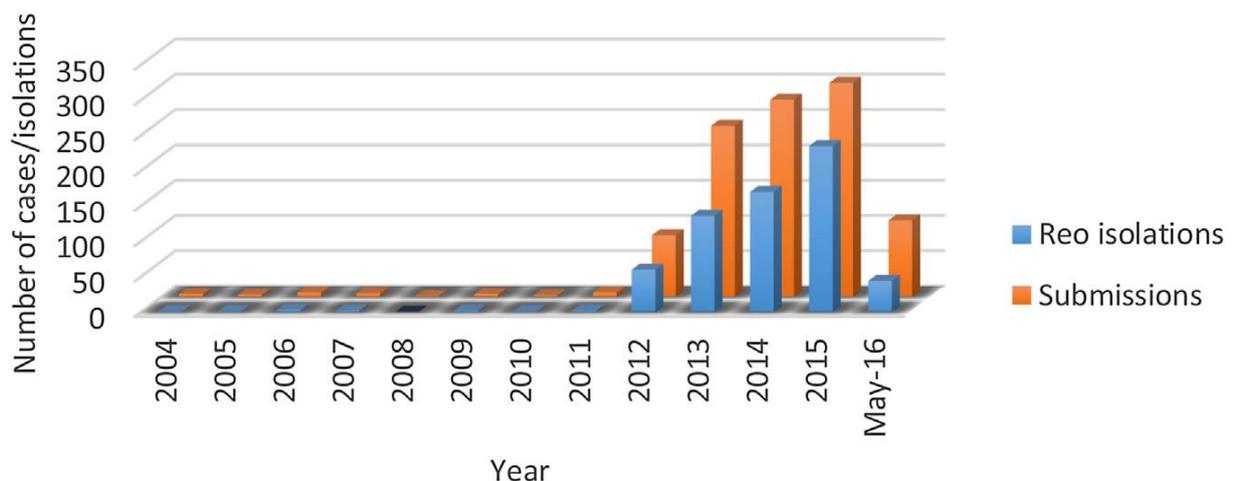


Figure 8 : Cas de téno-synovites et arthrites reportés sur la période 2004-2016 - Poultry Diagnostic and Research Center, University of Georgia, Athens, GA, USA (Sellers, 2017)

Le graphique de la Figure 3 ci-dessus illustre l'émergence de cas de téno-synovites et arthrites enregistrés sur la période 2004-2016 par l'Université de Géorgie.

On observe une augmentation brutale des cas rapportés (histogramme en orange à l'arrière-plan) et que des réovirus ont été isolés dans plus de la moitié de ces épisodes de téno-synovites et arthrites (histogramme bleu au premier-plan).

Une étude a, de plus, recensé sur la période 2011-2014 les cas d'infections à ARV dans des élevages de poulets de chair et de dinde en Pennsylvanie (Lu et al., 2015).

3.3.1 Manifestations cliniques

Sur la période 2011-2014, les infections par les réovirus ont généré des maladies cliniques et des pertes économiques considérables dans l'industrie pennsylvanienne de la volaille.

Plus précisément, le coût engendré par un épisode de réovirose dans les élevages de poulets de chair serait en moyenne de 23 000 \$ par élevage (soit environ 18 000 € en 2011, un élevage comptant en moyenne 28 000 poulets de chair en Pennsylvanie)

Dans les élevages étudiés, les oiseaux présentaient des boiteries et des déformations des pattes liées à des ténosynovites.

Ces inflammations tendineuses se situaient au niveau de l'articulation femoro-tibiotarsienne, inter-tarsienne et métacarpienne (face plantaire).

Dans certains cas, l'inflammation s'étendait aux muscles adjacents.

Les signes cliniques apparaissaient habituellement aux alentours de 2 à 4 semaines chez les poulets de chairs et après 10 semaines chez les dindes.

La morbidité était souvent élevée (jusqu'à 20-40%) et la mortalité atteignait 10% du lot dans les cas les plus sévères.

3.3.2 Lésions observées après autopsie

Les lésions majeures incluaient un gonflement œdémateux et des hémorragies dans les tendons et les gaines tendineuses et, dans les cas les plus chroniques, une rupture du tendon causant des hémorragies sévères. Des lésions de péricardite étaient également observées chez quelques sujets.

Au niveau des lésions microscopiques, la population cellulaire était principalement composée de lymphocytes et de plasmocytes.

3.3.3 Caractérisation des souches

Au total, plus de 300 échantillons furent récoltés sur la période 2011-2014.

L'isolement du virus fut, le plus souvent, réalisé à partir de tendons atteints. Des échantillons de cœur, de foie ou d'intestins ont également été employés.

Après mise en culture du virus sur tapis cellulaire LMH et observation d'un effet cytopathogène caractéristique des réovirus, une technique utilisant des anticorps fluorescents anti-ARV a permis de confirmer la présence de réovirus.

Une identification moléculaire par RT-PCR et séquençage de la protéine σ C a ensuite été réalisée. Ces techniques seront abordées plus en détails dans la suite de l'étude.

Au final, les souches d'ARV isolées furent regroupées en 6 groupes génétiques différents et seulement 22% des souches isolées appartenaient au groupe 1 (regroupant les souches vaccinales).

Cette diversité illustre, encore une fois, l'apparition de nouveaux variants qui sont éloignés génétiquement des souches « classiques ».

Ces souches sauvages peuvent alors échapper à la protection vaccinale et exprimer pleinement leur pouvoir pathogène.

3.3.4 Autre exemple dans la même région

Une co-infection impliquant 2 nouveaux variants de réovirus a également été décrite dans la littérature (Tang et al., 2016).

Cet événement s'est déroulé en 2014 et concerne un élevage de poules pondeuses en Pennsylvanie. Les 2 nouvelles souches ont été isolées à partir de tendons lésés et séquencées avec une méthode de nouvelle génération (technique NGS pour « Next-generation sequencing »). Les souches appartenaient alors aux groupes 3 et 5.

Ainsi, par l'utilisation de méthode de séquençage de nouvelle génération, cette étude a montré que l'on pouvait retrouver sur le terrain une co-infection avec 2 réovirus variants dans le même hôte.

3.4 Exemple d'épisodes cliniques au Canada

Tout comme aux Etats-Unis, des souches variantes de réovirus émergent au Canada depuis quelques années et engendrent des pertes économiques lourdes.

Une étude conduite dans des élevages de poulets de chair du Saskatchewan de 2013 à 2015 avait ainsi pour objectif de caractériser génétiquement ces variants. (Ayalew et al., 2017)

3.4.1 Signes cliniques, lésions et évaluation de la séroprévalence

Les animaux atteints présentaient des manifestations cliniques classiques de réovirose avec un gonflement unilatéral ou bilatéral des tendons gastrocnémiens.

Le reste du tableau clinique était similaire à celui observé en Pennsylvanie avec des déformations des pattes, des boiteries, des plumes ébouriffées et des oiseaux ayant des difficultés à se lever et à se déplacer.

En moyenne, les sujets présentant des signes cliniques représentaient 10 à 15% du lot.

A l'autopsie, une inflammation s'étendant des doigts au tarso-métatarse est présente, elle concerne la membrane synoviale et les tissus adjacents. En revanche, aucune lésion n'est observée au niveau des organes internes.

A l'histologie, les gaines tendineuses des individus malades étaient épaissies avec une infiltration majoritairement lymphocytaire et plasmocytaire et modérément hétérophilique.

Les lymphocytes étaient soit sous forme d'agrégats multifocaux ou diffus sur toute la longueur de la gaine tendineuse.

La présence de fibrose et d'un dépôt de collagène sont également fréquemment relevés.

3.4.2 Caractérisation des agents pathogènes

Comme précédemment, les virus furent isolés sur culture cellulaire à partir des tendons inflammés, puis purifiés.

Les particules virales étaient ensuite identifiées comme étant des réovirus par observation au microscope électronique, marquage Immunogold utilisant des anticorps anti-ARV et une technique d'immunofluorescence indirecte (avec des anticorps polyclonaux anti-réovirus).

Les 37 souches isolées furent ensuite séquencées.

Au final, l'ensemble des souches étudiées se situent dans les cluster II, IV, V et VI.

Enfin, un test de séroneutralisation a également été réalisé sur les souches isolées. Pour ce faire, des anticorps spécifiques de la souche vaccinale 2711 (prélevés sur des animaux vaccinés et possédant un titre sérologique supérieurs à 12000) ont été utilisés pour neutraliser différentes souches sur culture cellulaire.

Pour chacune des souches isolées, les anticorps vaccinaux ne neutralisaient pas le virus, un élément révélant à nouveau l'éloignement phylogénétique des souches isolées avec les souches vaccinales.

3.5 Emergence de cas en France en 2011-2012

3.5.1 Contexte

Une étude menée par des vétérinaires français et une équipe universitaire autrichienne s'est intéressé à des foyers de réovirose survenus dans le centre et l'ouest de la France en 2011 et 2012 (Troxler et al en 2013).

Ces épisodes étaient caractérisés par des boiteries et des retards de croissance apparus dans des troupeaux dont les reproducteurs étaient vaccinés contre la réovirose.

L'objectif de cette étude était alors d'étudier à la fois les signes cliniques et pertes économiques liés aux élevages touchés et également de séquencer la souche de réovirus responsable.

3.5.2 Résultats

Données d'élevages et observations cliniques :

Les troupeaux touchés étaient principalement composés de poulets Label Rouge mais on retrouvait également une atteinte chez des poulets standards. On retrouvait principalement comme signes cliniques des boiteries, une hétérogénéité de poids marquée au sein des troupeaux ainsi que de faibles taux de croissance.

Les symptômes apparaissaient aux alentours de 4-5 semaines chez les poulets Label Rouge (contre 2 semaines chez les poulets standards).

Les lésions macroscopiques se caractérisaient par un gonflement uni ou bilatéral des tendons gastrocnémiens, allant parfois jusqu'à la rupture tendineuse.

Concernant les reproducteurs dont sont issues ces troupeaux, ils avaient été vaccinés avec un mélange de différentes souches de réovirus (S1133, 1733, 3005, 2408, ERS).

Des tests sérologiques ELISA ont montré des titres en anticorps élevés chez les reproducteurs suite à cette vaccination ainsi qu'une bonne transmission de ces anticorps à la descendance.

Pertes économiques

La mortalité n'était pas élevée mais les conséquences économiques étaient, elles, considérables. En effet, la forte morbidité entraînait un indice de consommation élevé. Beaucoup d'animaux présentant des boiteries sévères ou des retards de croissance élevés ont été éliminés. En prenant en compte le taux de carcasses saisies à l'abattoir et les oiseaux éliminés en cours de lot, c'est plus de 20% du troupeau qui a été perdu dans certains cas.

Examen post-mortem

Après autopsie, le gonflement tendineux observé en élevage s'est révélé être lié à une ténosynovite.

Le tendon gastrocnémien était en effet fortement œdémateux, dégénéré avec parfois la présence de pétéchies. Des lésions plus chroniques de calcification tendineuse étaient également visibles sur certains sujets. Aucune autre lésion, notamment digestive, n'avait été mise en évidence.

Au niveau histologique, une accumulation lymphocytaire multifocale était présente.

Mise en culture et RT-PCR

Après mise en culture, un effet cytopathogène typique des réovirus était observé (après 1,2 ou 3 passages selon les isolats).

Pour confirmer la présence d'un réovirus, une RT-PCR avec les amorces P1/P4 (correspondant à des parties de séquences codant pour la protéine σ C) a été réalisée. Tous les échantillons se sont révélés positifs.

Analyse phylogénétique

Après séquençage, l'ensemble des échantillons étudiés appartenait au cluster I (regroupant les souches vaccinales).

Cependant, bien qu'appartenant au même cluster, les souches isolées sur le terrain possédaient une forte divergence génétique avec les souches vaccinales.

Les réovirus isolés sur le terrain ont ainsi pu être séparés en 3 groupes au sein du cluster I. Ces groupes étaient bien distincts génétiquement des souches vaccinales.

La place dans la classification d'un représentant de chacun de ces 3 groupes est montrée dans l'arbre phylogénétique ci-dessous (Figure 6).

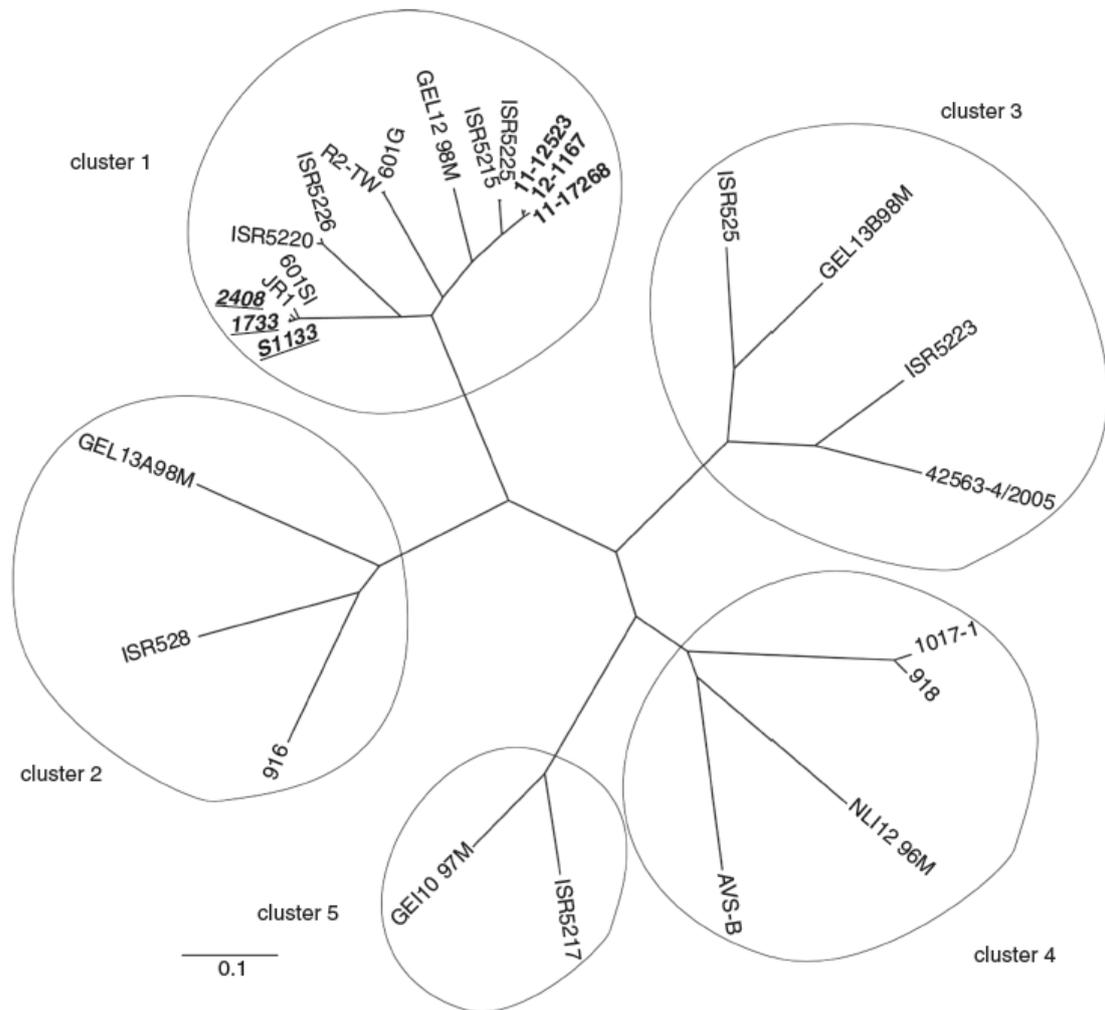


Figure 9 : Arbre phylogénétique montrant les 5 clusters des reovirus aviaires. 3 représentants des souches isolées dans l'étude (11-12523 / 12-1167 / 11-17268) sont placés dans le cluster I et correspondent à 3 groupes distincts. Les souches vaccinales sont écrites en italique, gras et souligné (Troxler et al., 2013)

Sérologie

Afin d'étudier l'efficacité vaccinale face aux souches isolées, des sérums ont été prélevés sur des poulets SPF ayant reçu trois souches vaccinales différentes. Un test de séro-neutralisation a ensuite été réalisé entre ces sérums et les souches terrains. Le résultat est que les souches terrains n'étaient neutralisées par aucun des anticorps post-vaccinaux testés.

3.5.3 Discussion et conclusion

Les cas de ténosynovites à réovirus décrits ici sont causés par des souches appartenant au cluster I regroupant les souches vaccinales. Malgré cela, les souches isolées sur le terrain sont fortement éloignées génétiquement des souches employées habituellement pour la vaccination des reproducteurs. Les différents échantillons ont pu être regroupés en 3 groupes génétiques. De plus, il existait une corrélation entre l'appartenance à un groupe génétique et le couvoir d'origine.

L'hypothèse principale est alors la suivante : la transmission du virus s'est sans doute faite verticalement à partir de reproducteurs contaminés. Le virus s'est ensuite répandu horizontalement au couvoir à partir des poussins issus de ces reproducteurs.

Ainsi, une contamination croisée au couvoir a probablement eu lieu entre des poussins d'origines diverses éclos le même jour. Les tests sérologiques associés aux analyses phylogénétiques ont, de plus, permis de montrer l'inefficacité des programmes de vaccination usuels contre la réovirose.

Les souches d'ARV isolées correspondent donc à des souches nouvelles, à haut potentiel pathogène et échappant à la protection vaccinale. Les pertes économiques engendrées sont considérables.

3.6 Résumé d'autres cas d'émergence rapportés

3.6.1 Tunisie (Kort et al., 2015)

15 souches de réovirus ont été étudiées en Tunisie, l'isolement de ces souches s'étalant sur une dizaine d'années (de 1998 à 2008).

Les troupeaux dont provenaient ces isolats présentaient des signes d'arthrite virale ou des syndromes de malabsorption. Dans certains élevages, la maladie n'était pas bien définie.

Les individus touchés étaient soit des poulets de chair (entre 10 et 30 jours d'âge), soit des reproducteurs (entre 3 et 26 semaines d'âge). Après amplification par RT-PCR, les différents réovirus ont été discriminés par une technique RFLP.

Ce protocole a permis de montrer que les souches terrains pouvaient être distinguées des souches vaccinales, bien qu'elles appartiennent au même groupe génétique.

3.6.2 Chine

De 2011 à 2015, des cas de ténosynovites à réovirus sont apparus dans le nord de la Chine.

Sur le même principe que les exemples précédents, les différentes souches (11 au total) ont été isolées par mise en culture cellulaire et RT-PCR. Une analyse phylogénique a permis de montrer que la majorité des souches appartenait au cluster I et que 2 souches étaient reliées au cluster III.

L'intérêt de cette étude réside également dans l'infection expérimentale avec des souches de terrains et la souche vaccinale S1133, qui a été mise en œuvre sur des poulets SPF. Cette expérience a montré que les réovirus émergents isolés possédaient un pouvoir de réplication supérieur à la souche S1133 et entraînaient également une plus forte mortalité. Ces résultats vont dans le sens d'un phénomène d'augmentation de la virulence des souches sauvages de réovirus en Chine.

3.7 Conclusion sur ces exemples

On a donc vu que l'apparition de nouveaux réovirus variants constitue une problématique d'ordre mondiale.

Elle touche particulièrement l'Amérique du Nord mais les autres régions du globe ne sont pas épargnées (notamment la France, comme on le verra par la suite).

Ce phénomène d'émergence a connu un certain essor depuis une vingtaine d'année, sans que l'on puisse vraiment l'expliquer.

En effet, la vaccination à l'aide de souches classiques (S1133, 2408, 1733), qui permettait autrefois de juguler la réovirose, a montré des pertes d'efficacité conduisant à l'apparition de signes cliniques même chez des sujets correctement vaccinés.

La caractérisation phénotypique et génotype des nouvelles souches a alors permis d'apporter des éléments de réponses sur ces échecs de vaccination.

Nous allons maintenant nous intéresser plus en détail aux stratégies qui ont été développées suite à cette résurgence de nouveaux cas, tant en matière de diagnostic que de lutte.

4. Stratégies de diagnostic et de lutte contre la réovirose

4.1 Méthodes de diagnostic

4.1.1 Diagnostic clinique et nécropsique

En élevage, les principaux signes observés seront des boiteries avec un gonflement unilatéral ou bilatéral au niveau des tendons gastrocnémiens.

Après autopsie, on pourra mettre en évidence des ténosynovites et arthrites.

Ces dernières ne sont cependant pas pathognomoniques de l'infection par les réovirus et le diagnostic différentiel peut se faire avec :

- La mycoplasmosse à *Mycoplasma synoviae*
- D'autres arthrites bactériennes
 - *Staphylococcus spp.*
 - *Enterococcus spp.*
 - *Escherichia coli*
 - *Pasteurella spp.*
 - *Ornithobactérium rhinotracheale* (chez la dinde)
- Astrovirus

Dans le cas des mycoplasmes, une analyse PCR peut-être réaliser à partir d'écouvillons trachéaux ou articulaires pour détecter la présence de *M.synoviae*. Une analyse sérologique est également possible.

On pourra également réaliser une culture bactérienne pour mettre en évidence la présence d'un Staphylocoque, d'un colibacille...

Une étude (Wit et al., 2012) rapporte l'implication d'astrovirus dans des ténosynovites et syndromes de malabsorption. Cette hypothèse peut donc être envisagée, même si ce phénomène reste rare.

Dans le cas d'un tableau clinique plutôt évocateur d'un syndrome de malabsorption, on aura des signes cliniques digestifs et des retards de croissance apparaissant le plus souvent chez des individus de 1 à 3 semaines.

On peut faire le diagnostic différentiel avec :

- La coccidiose (plutôt chez des poulets de 3 à 6 semaines)
- La proventriculite virale à *Birnavirus*

Un raclage des différents segments de l'intestin (duodénum, jéjunum, iléon) permettra de mettre en évidence d'éventuelles coccidies.

On pourra tenter d'isoler et de rechercher par RT-PCR les autres agents viraux impliqués dans le syndrome de malabsorption : rotavirus, coronavirus, parvovirus, astrovirus.

Des signes comme l'atteinte des tendons extenseurs du métacarpe ou fléchisseurs des doigts ainsi que l'infiltration hétérophilique du myocarde peuvent orienter le diagnostic vers une réovirose.

La mise en évidence du virus est cependant nécessaire pour confirmer la présence d'un réovirus et écarter celle d'autres agents infectieux.

4.1.2 Apport de l'histologie

Bien que n'apportant pas un diagnostic de certitude, l'observation des lésions de ténosynovites au microscope constitue un apport diagnostique non négligeable.

La description des lésions histologiques a été détaillée dans la partie 2.2.5.

On pourra évaluer la chronicité des lésions par l'étude des populations cellulaires présentes (lymphocytes, hétérophiles, macrophages, réticulocytes) et l'évaluation de l'état de fibrose et de dégénérescence des structures tendineuses.

On pourra également rechercher d'éventuelles lésions d'entérites et infiltrations hétérophiliques du myocarde.

4.1.3 Mise en évidence directe du virus

4.1.3.1 Isolement par mise en culture cellulaire

On l'employait beaucoup jusqu'à récemment, elle est peu à peu remplacée par la RT-PCR.

Les réovirus font partie des virus qui se développent aisément en culture cellulaire. Cela peut constituer un biais. En effet, leur isolement ne signifie pas forcément qu'ils sont responsables des lésions observées.

De plus, ces virus étant ubiquitaires et naturellement présents dans le tube digestif, l'isolement à partir de prélèvements intestinaux seuls ne constitue pas une preuve significative d'implication dans des ténoosynovites.

Les tissus prélevés doivent en conséquence être judicieusement choisis pour éviter ce biais. Il est préférable d'utiliser des tendons (et les os sésamoïdes associés), des membranes synoviales ou du cartilage articulaire. Ces prélèvements tissulaires seront préférés aux écouvillons articulaires qui permettent une moins bonne extraction virale.

Des tissus d'individus apparemment sains peuvent également être collectés.

D'une part, les sujets cliniquement atteints représentent souvent un faible pourcentage du lot et le virus peut être présent avant le développement des lésions de tendinite.

Et d'autre part, l'isolement n'est parfois pas réalisable à partir de tissus présentant des lésions trop sévères.

L'isolement est optimal lorsque l'on injecte le virus à des œufs embryonnés (après 6 jours d'incubation en moyenne) ou des cultures cellulaires d'embryons de poulet (de foie principalement).

L'infestation de l'embryon se fait au niveau du sac vitellin, le virus tue l'embryon en 5 à 6 jours, ce dernier est hémorragique avec des foyers de nécrose hépatiques.

La culture cellulaire sur cellules d'embryon de foie de poulet se caractérise par la formation de syncytia, déjà évoquée précédemment, qui est l'effet cytopathogène (ECP) typique des réovirus.

Les cellules atteintes se décolent du tapis cellulaire pour se retrouver dans le milieu de culture après quelques jours. On peut également observer des inclusions intranucléaires éosinophiles après coloration à l'hématoxyline-éosine.

Si le virus est présent en faible quantité dans les tissus, plusieurs passages en culture cellulaire peuvent être nécessaires à l'isolement (3 à 5 passages en moyenne).

Après la mise en culture, plusieurs options sont possibles pour identifier les réovirus.

4.1.3.2 Microscopie électronique

L'utilisation de la microscopie électronique peut se faire sur le tapis cellulaire après la mise en culture.

Des éluats d'écouvillonnage, des broyats d'organe ou des embryons peuvent servir de matrice pour l'observation du virus. Une coloration négative ou par immunofluorescence est employée pour mettre en évidence la structure caractéristique de la particule virale.

On ne peut cependant pas déterminer la souche du réovirus avec cette technique (Jones, 2000).

4.1.3.3 Immunodiffusion sur gélose

L'immunodiffusion sur gélose (également appelé test AGP pour « Agar gel precipitin ») est un test utilisé historiquement pour détecter des antigènes de groupe qui sont communs à tous les réovirus (Jones, Guneratne, 1984).

Pour ce test, on utilise des œufs embryonnés de 9 à 10 jours, on inocule l'échantillon par la membrane chorio-allantoïdienne, puis cette dernière est prélevée 7 jours plus tard sur les embryons. Les membranes obtenues sont homogénéisées et utilisées comme antigène.

On peut se servir de ce test pour identifier un réovirus dans un prélèvement (grâce à un antisérum dirigé contre les réovirus) ou pour caractériser la réponse sérologique dans un troupeau affecté (voir partie 4.1.4.1).

4.1.3.4 Immunofluorescence directe

Cette méthode de détection utilise des anticorps dirigés contre les antigènes des réovirus, et marqués à la fluorescéine.

Cette technique a plutôt été utilisée historiquement pour étudier la diffusion du virus dans les tissus.

4.1.3.5 Identification moléculaire par RT-PCR

La RT-PCR est une méthode de plus en plus utilisée pour le diagnostic de laboratoire car c'est une technique rapide et sensible comparée aux autres outils de détection.

Un isolement sur culture cellulaire nécessite en effet 3 à 5 jours pour chaque passage et souvent 2 à 3 passages pour conclure.

Les tests sérologiques quant à eux, que nous détailleront ensuite, sont rapides mais demeurent moins sensibles et surtout, moins spécifiques, que la PCR.

Elle permet également de s'affranchir des anticorps présents chez les individus vaccinés.

Nous allons nous intéresser aux différentes techniques de RT-PCR développées comme outils diagnostiques des réoviroses aviaires.

PCR classique

La PCR (pour Polymerase Chain Reaction) permet d'amplifier une séquence particulière d'ADN. L'ADN est amplifié suivant 30 à 40 cycles pour obtenir environ 34 milliards (2^{40} !) de copies pour 2 brins d'ADN initiaux.

La RT-PCR (Reverse-transcriptase PCR)

Lorsque le matériel génétique que l'on souhaite amplifier est de l'ARN, comme dans le cas des réovirus, on passe par une étape préalable impliquant une transcriptase inverse (reverse transcriptase). Cette dernière va permettre d'obtenir de l'ADN à partir de l'ARNdb du virus.

Une fois l'ADN obtenu, on l'amplifie par une technique de PCR classique.

De nombreuses publications décrivent l'utilisation de cette technique sur les réovirus depuis une vingtaine d'année (Xie et al., 1997 ; Bruhn et al., 2005 ; Kant et al., 2003 ; Kort et al., 2015).

L'étude de Kant et al en 2003 a notamment décrit les amorces P1 et P4, amplifiant un segment de plus de 1kb du gène *sigmaC* qui seront réutilisées par la suite (Troxler et al., 2013).

RT-PCR nichée

Cette technique fut utilisée en 1997 par Liu et al (Liu et al., 1997)

Le principe de la PCR nichée repose sur le même principe qu'une PCR classique, à la différence près que l'on emploie 2 lots d'amorces successifs.

En effet, le premier lot d'amorces permet l'amplification de la séquence recherchée, mais également de produits non désirés par fixation des amorces sur d'autres portions de l'ADN.

La deuxième paire d'amorces, utilisée successivement, va pouvoir se fixer à l'intérieur du premier produit d'amplification PCR avec la séquence recherchée.

Ces amorces ne se fixeront pas aux produits parasites qui ne seront alors pas amplifiés.

D'après Liu et al, cette technique permettrait à la fois d'éliminer les produits non désirés et serait également plus sensible qu'une PCR classique.

RT-PCR multiplex

La PCR multiplex permet d'amplifier plusieurs produits à la fois avec l'utilisation de plusieurs amorces simultanément. Concrètement, elle permet de rechercher plusieurs agents pathogènes en même temps dans un prélèvement sans multiplier les analyses.

Ce type de PCR a été étudié en lien avec les réovirus aviaires, notamment dans 2 études.

Une première (Caterina et al., 2004) s'est intéressé au développement d'une PCR multiplex permettant la détection simultanée d'adénovirus aviaires du groupe I (AAV-I), du virus de la maladie de Gumboro (IBDV), du virus de l'anémie infectieuse (CAV) et des réovirus aviaires (ARV).

Cette méthode s'est avérée être sensible et spécifique, et économiquement intéressante. Elle constituerait, de plus, un gain de temps non négligeable en matière de diagnostic et donc de prise en charge par la suite.

Une seconde publication a utilisé une PCR multiplex pour la recherche simultanée de *Mycoplasma synoviae* et des ARV. Tout comme l'étude précédente, cet outil s'avère être sensible et spécifique pour les deux agents étiologiques.

Cette technique pourrait alors être utile pour un diagnostic rapide dans des conditions cliniques où les deux agents pathogènes sont suspectés (arthrites et ténosynovites). Elle servirait également à faciliter le dépistage, la surveillance et le contrôle des infections à *Mycoplasma synoviae* et aux réovirus aviaires.

RT-PCR temps-réel

La particularité de la PCR temps-réel (ou PCR quantitative), c'est qu'elle permet à la fois l'amplification de l'ADN mais également la quantification de cet ADN initialement présent.

En effet, l'ajout de sondes fluorescentes qui libèrent de la fluorescence lorsqu'elles se fixent à l'ADNdb permet de suivre la quantité d'ADNdb produite. La fluorescence est détectée à partir d'un certain seuil où elle connaît une croissance exponentielle. Le dépassement de ce seuil de fluorescence apparaît au bout d'un certain nombre de cycle. On appelle ce nombre de cycle le Ct (pour Cycle threshold, c'est-à-dire le « cycle seuil »). Plus le Ct est bas, plus la concentration initiale en ADN de l'échantillon était élevée.

La RT-PCR quantitative constitue donc une technique intéressante pour évaluer la charge virale présente dans les échantillons évalués. On retrouve ainsi quelques exemples récents d'application de la PCR quantitative aux réovirus aviaires.

En 2006, une première publication (Ke et al., 2006) relate le développement d'une PCR temps-réel pour la détection des réovirus aviaires. Cette PCR quantitative utilise un marqueur fluorescent de type SYBR Green I qui a la capacité de se fixer au petit sillon de l'ADN sous sa forme double-brin.

Ici, c'est la partie du génome codant pour la protéine σA qui est amplifiée. Au final, cette technique de PCR s'avère être plus sensible (de 3 log₁₀) et plus rapide que la RT-PCR classique. Elle constitue donc un bon outil diagnostique.

Une autre étude a permis d'évaluer une autre PCR temps-réel, amplifiant une portion du génome S4 et utilisant une sonde de type TaqMan. D'après les résultats obtenus, l'utilisation de cette sonde augmenterait encore la spécificité par rapport à une PCR temps-réel de type SYBR Green I (Guo et al., 2011).

Enfin, une PCR temps-réel duplex a également fait l'objet d'une étude. Elle permettait de détecter simultanément *M.synoviae* et les réovirus, deux agents majeurs d'arthrites chez la volaille (Li Huang et al., 2015).

4.1.4 Techniques sérologiques

Les techniques développées ici sont moins sensibles et spécifiques que les techniques de PCR que nous avons abordées précédemment. Elles demeurent malgré tout essentiel pour évaluer la réponse immunitaire des reproducteurs et de leur progéniture et mettre en évidence un passage viral dans un élevage.

4.1.4.1 Immunodiffusion sur gel

Comme évoqué précédemment, ce test peut être utilisé pour caractériser la réponse sérologique d'un troupeau. Ce sont les anticorps précipitants, communs à tous les réovirus aviaires, qui sont mis en évidence ici. Bien que rapide et facile à mettre en œuvre, ce test est peu sensible et peu spécifique.

4.1.4.2 Immunofluorescence indirecte

L'immunofluorescence indirecte consiste à utiliser des anticorps marqués par un fluorochrome et dirigés contre les anticorps que l'on veut tester.

Les anticorps marqués seront choisis de manière à avoir une forte affinité pour les anticorps testés. Une fois liés à ces derniers, les anticorps marqués émettront de la fluorescence qui pourra être mesurée. Cette méthode est plus sensible que la précédente mais l'interprétation de la fluorescence, qui permet d'évaluer le titre en anticorps, reste subjective (Ide, 1982).

4.1.4.3 Western-Blot

Cette méthode de diagnostic a été utilisée en 1990 comme test sérologique vis-à-vis des réovirus (Endo-Munoz, 1990).

On fait migrer les protéines virales dans un gel de polyacrylamide et on les transfère sur une feuille de nitrocellulose. Cette dernière est ensuite découpée et chaque bandelette obtenue est mise en présence de l'échantillon de sérum à tester.

L'ajout d'une antiglobuline (anticorps secondaire) couplé à une enzyme va conduire à une réaction immuno-enzymatique mettant en évidence les réaction protéines virales-anticorps.

Cette technique est plus sensible que l'immunofluorescence indirecte.

4.1.4.4 Séroneutralisation par réduction des plages de lyses

Les étapes de cette technique sont les suivantes :

- Le sérum à tester est mis en présence de souches de réovirus connues et le mélange est mis à incuber
- Après incubation, le mélange est inoculé à une culture cellulaire pour évaluer la pathogénicité du virus après neutralisation par les anticorps.

Deux options sont alors possibles :

- On peut utiliser des sérums connus pour déterminer le sérotype des réovirus que l'on teste (cf partie 4.1.5)
- Soit c'est le sérum que l'on veut tester avec une souche connue.

Dans le deuxième cas, on utilise des dilutions successives et on observe la réduction de l'effet cytopathique (plages de lyses).

La concentration de sérum qui réduit de 50% les plages de lyse (par rapport au virus seul) permet de déterminer le titre en anticorps neutralisants dans le sérum.

Une étude de 2006 (Astawa, 2006) a utilisé un test de séroneutralisation pour montrer que des anticorps monoclonaux dirigés contre les protéines μ BN, μ BC et σ C étaient neutralisants.

4.1.4.5 Sérologie par ELISA indirect

Rappel sur le principe de la méthode immuno-enzymatique ELISA

Des antigènes sont déposés sur une surface sur laquelle on applique le sérum à tester. Une antiglobuline couplée à une enzyme modificatrice de substrat est ensuite ajoutée pour se fixer aux anticorps du sérum. Après ajout du substrat de l'enzyme, une réaction soit chromogénique soit fluorescente a lieu s'il y a eu formation de complexe anticorps/antigène.

L'intensité de la réaction est le plus souvent évaluée par spectrophotométrie et un titre en anticorps peut être calculé.

Utilisation dans le cadre des réovirus aviaires

Elle est très sensible et spécifique, rapide d'utilisation et économique. C'est donc la méthode de choix pour évaluer une réponse sérologique dans un élevage en pratique.

Une corrélation significative a de plus été démontrée entre les résultats obtenus par ELISA conventionnel et le test de séroneutralisation évoqué précédemment (Islam, Jones, 1988).

Plus récemment, une méthode ELISA utilisant les protéines σB et σC comme antigène a montré une corrélation encore plus marquée avec le test de réduction des plages de lyses que l'ELISA conventionnel (Liu et al., 2002 ; Shien et al., 2000).

On peut également ajouter que des ELISA permettant de distinguer les sujets infectés des sujets vaccinés (stratégie DIVA) ont fait l'objet de publications.

Cette différenciation entre les deux types d'individus a pu se faire par l'utilisation comme antigène :

- De protéines non-structurelles σNS et P17 (Xie et al., 2010)
- De la protéine σC (Goldenberg et al., 2011)

L'avantage de la deuxième méthode est que, d'une part, elle s'inscrit dans le cadre de la stratégie DIVA et, d'autre part, elle permet de détecter les anticorps neutralisants chez les sujets vaccinés. Elle apporte ainsi une information sur les propriétés protectrices des anticorps produits après vaccination.

Les kits commerciaux développés actuellement (ProFLOK®REO ELISA par ZOETIS™, REO ELISA CK110 par BIOCHEK ou IDEXX REO Ab Test) ne permettent pas de distinguer les animaux vaccinés des infectés.

Ils constituent cependant un outil précieux en matière d'évaluation de la réponse vaccinale. (Zavala, 2010)

4.1.5 Méthodes de typage des réovirus aviaires

4.1.5.1 Sérotypage

Les sérotypes des souches isolées sont définis en fonction du test de séroneutralisation développé précédemment.

Le nombre de sérotypes n'est cependant pas encore bien déterminé. Il existe en effet de nombreuses réactions croisées, ce qui rend difficile la classification des différentes souches. Cette classification correspondrait donc plutôt à des sous-types qu'à des sérotypes au sens strict.

Wood et al ont défini qu'il existait au moins 11 sérotypes différents chez les réovirus aviaires (REF).

Une étude de 2001 de Van Loon a comparé différents isolats de réovirus décrits dans la littérature selon leur réaction en présence d'anticorps monoclonaux. Les résultats sont présentés dans le Tableau 4 (Van Loon et al, 2001).

Souche	Identification et année d'isolement	Pays	68A (Lapin)	154	14-37 INT	INT 14-11	INT 13-6	15-1 INT
S-1133	Van der Heide (1974)	USA	+	+	+	+	+	+
2408	Rosenberger (1983)	USA	+	+	+	+	+	+
UM 203	Johnson (1972)	USA	+	+	+	+	+	+
WVU 1675	Olson (1957)	USA	+	+	+	+	+	+
Enterovax	MBL (Vaccin)	USA	+	+	+	+	+	+
Tensynovae	Intervet (Vaccin)	USA	+	+	+	+	+	+
1733	Rosenberger (1983)	USA	+	+	+	+	+	-
2177	Rosenberger (1989)	USA	+	+	+	-	-	+
CO8	Hieronimus (1982)	USA	+	+	+	-	+	+
ERS-1	Van Loon (1998)	Pologne	+	+	+	-	-	-
ERS-2	Van Loon (1999)	Pologne	+	+	+	-	-	-

Tableau 4 : Identification de souches de réovirus selon leur pattern de réaction aux anticorps monoclonaux (d'après Van Loon et al, 2001)

On voit que les profils de réaction aux différents anticorps monoclonaux ne sont pas les mêmes en fonction des souches.

En particulier dans cette étude, c'est le variant ERS (Entéric Reovirus Strains) qui a été mis en évidence et qui constitue un sérotype à part des autres souches testées, notamment des souches vaccinales. Il était ici impliqué dans des syndromes de malabsorption et de fortes mortalités en Pologne.

Comme on l'a vu dans la partie 1.6, la classification des souches peut se faire suivant le sérotype ou le génotype. La classification en sérotypes est réalisée par des techniques de séroneutralisation développées précédemment.

Nous allons ici préciser des techniques d'identification décrites dans la littérature.

4.1.5.2 RFLP

Cette technique est mise en œuvre dans plusieurs études voulant caractériser des réovirus aviaires émergents isolés sur le terrain (Kort et al., 2015 ; Hedayati et al., 2013 ; Ayalew et al., 2017).

En résumé, le principe de cette technique est de récupérer les produits d'amplification obtenus par RT-PCR et d'y ajouter des enzymes de restriction.

Ces enzymes vont venir couper l'ADN au niveau de sites de restriction bien définis. On fait ensuite migrer les différents fragments d'ADN obtenus suite à l'action des enzymes sur un gel d'électrophorèse. L'ajout de sondes marquées permet de mettre en évidence les fragments après migration. On peut ainsi distinguer ou rapprocher les isolats d'ARV entre eux en fonction de leur profil de migration.

4.1.5.3 Séquençage de la protéine σ C

Comme on l'a évoqué précédemment, le gène codant pour la protéine σ C est le plus variable sur le génome des réovirus.

Elle constitue donc un outil de choix pour distinguer les souches de réovirus entre elles et les classer.

Le séquençage de cette protéine permet de regrouper les souches terrains au sein de cluster.

Des techniques d'alignement des séquences permettent de comparer les souches entre elles et de les distinguer selon leurs divergences génétiques.

Des arbres phylogénétiques peuvent ensuite être construits afin de matérialiser l'appartenance à ces différents groupes et l'éloignement génétique entre les isolats.

Cela a notamment été réalisé par Kant et al en 2003 pour des souches néerlandaises et belges (Kant et al., 2003).

Pour résumer, cette étude avait comme objectif de séquencer le gène σC de différents isolats issus d'élevage de volailles hollandais et belges sur la période 1980-2000. Après séquençage, les souches ont été comparées entre elles et avec d'autres souches dont la séquence est déposée dans les banques de données. Les chercheurs ont pu ainsi déterminer 5 clusters différents. La Figure 5 reprend l'arbre phylogénétique qui ressort de cette étude.

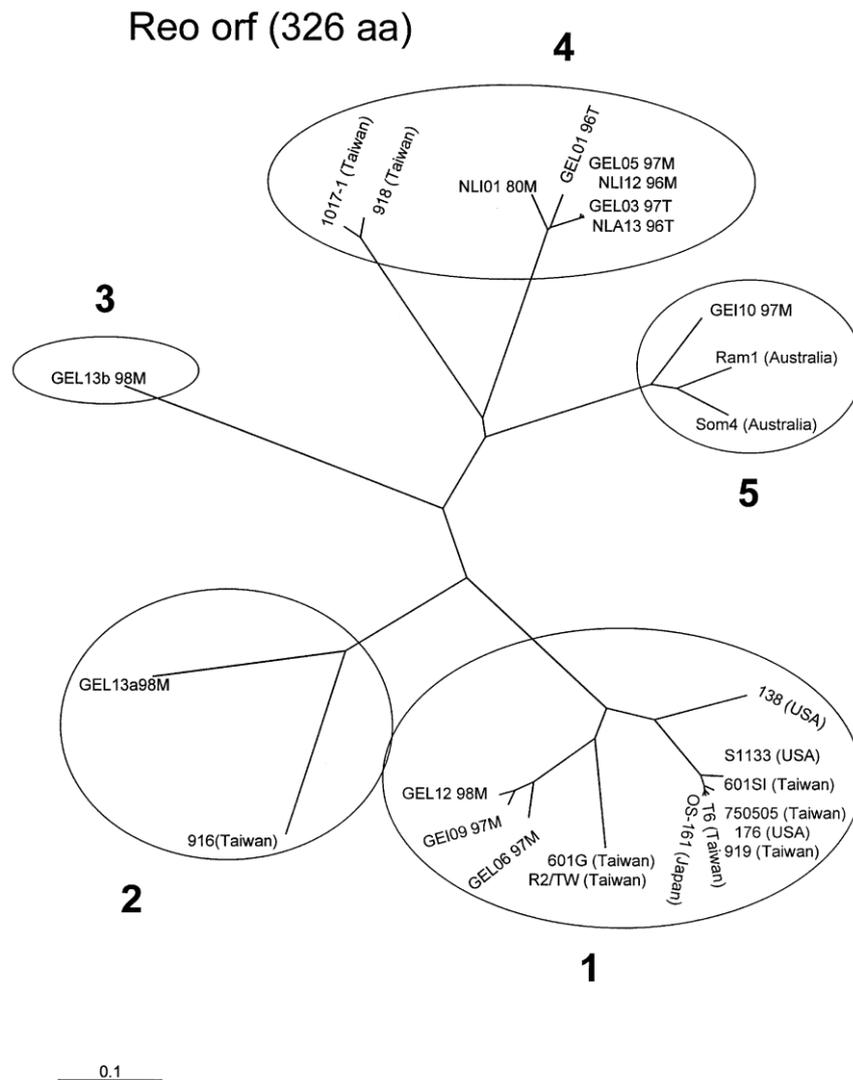


Figure 10 : Arbre phylogénétique des souches isolées en 1980-2000 aux Pays-Bas et en Belgique

A noter que les souches utilisées habituellement en vaccination (S1133, 1733, 2408) appartiennent au cluster I.

D'autres études similaires ont été réalisées dans plusieurs pays dans le monde.

L'équipe de Lu et al s'est par exemple intéressée aux réovirus émergents sur la période 2011-2014 en Pennsylvanie. Un sixième cluster a été alors mis en évidence.

4.1.6 Virulence et tropisme des souches

Certaines souches vont plutôt être associées à des ténosynovites, d'autres plutôt à des syndromes de malabsorption.

Le Tableau 5 regroupe quelques souches, ainsi que les symptômes qu'elles ont tendance à induire.

Souches	Pays d'origine	Symptômes	Cluster
S1133, 1733, 138, 176	USA	Ténosynovites	1
705505, 601G, 601SI, R2/TW	Taiwan	Ténosynovites	1
GEL0196T, GEL0397T, GEL0497T	Allemagne	Ténosynovites	4
2408, OS-161	USA, Japon	Malabsorption	1
916, 918	Taiwan	Malabsorption	2, 4
GEL1500M	Allemagne	Malabsorption	5
T6	Taiwan	Respiratoire	1

Tableau 5 : Association entre quelques souches et les symptômes qu'elles provoquent

Il ne semble pas y avoir en revanche de lien entre l'appartenance à un cluster et un tropisme particulier. Outre des symptômes différents, les souches présentent également des niveaux de virulence variés.

Différents niveaux de pathogénicité ont ainsi pu être déterminés en comparant les souches entre elles après inoculation à des poulets.

Par exemple, dans une étude de Rosenberger et al en 1989, des poulets d'âges variés ont été infectés avec 4 souches différentes de réovirus (2177, 2035, 2408 et 1733).

La souche 2177 présentait un faible pouvoir pathogène et n'entraînait pas l'apparition de signes cliniques ou de perte de poids.

L'isolat 2035 était de pathogénicité intermédiaire, entraînant une mortalité de 8%, une perte de poids à 7 semaines et des lésions microscopiques intestinales et tendineuses.

Enfin, les souches 2408 et 1733 furent considérées comme à haut pouvoir pathogène, car elles engendraient des signes cliniques sévères (retard de croissance et ébouriffement des plumes) associés à une forte mortalité (84%). Des lésions microscopiques étaient également présentes sur le foie, les intestins, le pancréas et les tendons gastrocnémiens.

Les virus fortement pathogènes persistaient également plus longtemps dans les tissus infectés (Rosenberger et al., 1989).

Des comparaisons similaires ont été effectuées sur des souches à téno-synovites (Jones, Guneratne, 1984) et provoquant un syndrome de malabsorption (Kibenge, Dhillon, 1987).

Enfin, des études plus récentes ont montré que les souches émergentes présentaient une virulence supérieure aux souches classiques (souche S1133 par exemple) (Zhong et al., 2016).

4.2 Les méthodes de lutte passent essentiellement par la vaccination

Les réovirus étant très résistants dans l'environnement et ubiquitaires, il est difficile de lutter efficacement contre eux avec de simples mesures de biosécurité.

Celles-ci demeurent essentielles pour réduire la pression d'infection des réovirus comme de nombreux autres agents pathogènes.

Elles doivent toutefois être associées à d'autres stratégies pour optimiser la protection contre la maladie.

Une fois la maladie installée, on peut traiter de manière symptomatique à l'aide d'anti-inflammatoires non stéroïdiens (acide salicylique par exemple).

En réduisant l'inflammation et la douleur, les individus atteints auront moins de réticence à se déplacer, à s'alimenter et les conséquences économiques pourront être moins pénalisantes.

Malgré cela, la stratégie de lutte la plus efficace reste la prophylaxie vaccinale.

4.2.1 La vaccination contre la réovirose

La période de haute sensibilité aux réovirus pathogènes chez *Gallus gallus* se situe entre 1 jour et 2 semaines. Après ce laps de temps, les individus développent une résistance à l'infection. La maladie pourra par contre mettre plusieurs semaines à se manifester.

Le défi ici est donc d'apporter une protection au poussin dès l'éclosion. Les programmes de vaccination passent alors principalement par l'administration de vaccins vivants et inactivés aux reproducteurs afin d'obtenir un transfert d'immunité à la descendance.

La vaccination des reproductrices permet ainsi à la fois de limiter une potentielle transmission transovarienne du pathogène et de protéger la descendance pendant la période sensible.

Les anticorps maternels évitent également qu'une éventuelle souche pathogène se répliquant dans le tube digestif atteigne les articulations.

Les réovirus sont considérés comme peu immunogène en comparaison avec d'autres virus. Cela est lié aux mécanismes d'échappement à la réponse immunitaire comme la synthèse de macrophages suppresseurs. La vaccination doit alors être répétée pour stimuler au mieux l'immunité.

Chez les reproducteurs, il est ainsi fréquent de vacciner les poulettes deux fois avec un vaccin vivant dans les 6 premières semaines de vie.

Deux à trois rappels avec des vaccins inactivés sont ensuite effectués uniquement chez les poulettes. Cela permet d'avoir une stimulation des anticorps maternels avant l'entrée en ponte (Zavala, 2010).

Une étude de 1986 (Wood et al. 1986) a montré que cette utilisation de vaccin inactivés et vivants (souche S1133) sur des femelles reproductrices permettait d'obtenir une bonne protection de la descendance avec une baisse des signes cliniques et de la mortalité par rapport à un lot non vacciné. La protection était cependant variable en fonction des souches rencontrées par la descendance par la suite.

Les vaccins sont le plus souvent élaborés à partir de la souche S1133 sous forme d'une émulsion « eau dans l'huile » associée à un adjuvant. D'autres souches telles que 1733, 2408 ou 2177

peuvent également faire partie de la préparation vaccinale. Cet ajout d'autres souches permet d'élargir la protection au syndrome de malabsorption notamment.

En France, les vaccins utilisés actuellement sont le NOBILIS REO INAC® et le NOBILIS REO S1133®.

Le premier est un vaccin inactivé comprenant les souches S1133 et 2408, le second est un vaccin vivant atténué de la souche S1133.

Pour ce vaccin en particulier, il est recommandé de faire une primo-vaccination avec le vaccin atténué sur les reproductrices entre 7 et 10 semaines d'âge et un rappel de vaccination avec la souche inactivée à 16-20 semaines d'âge. La vaccination des parents avec un vaccin vivant puis inactivé permet d'obtenir un taux d'anticorps maternels important chez la progéniture.

Il est recommandé de ne pas administrer le vaccin vivant après le début de la ponte. En effet, cela conduit à la transmission transovarienne du vaccin et au développement de signes cliniques chez la descendance (Giambrone et al., 1991 a.)

Il est rare de vacciner les poulets de chair. Les poussins peuvent toutefois être vaccinés avec le vaccin atténué entre J5 et J15 selon le statut des reproductrices (plutôt à 10-15 jours d'âge si les mères sont hyperimmunisées).

La vaccination par nébulisation ou eau de boisson a été étudiée par Giambrone au début des années 1990 (Giambrone et al 1991 b. ; Giambrone et al., 1992). Les résultats montrent que cette vaccination des poussins d'1 jour permet d'augmenter la résistance à l'infection à partir de 7 jours d'âge. Cette résistance se traduisait par une diminution des lésions macroscopiques de type ténosynovite et entérite.

A noter qu'il peut exister une interférence entre la vaccination contre la réovirose et le vaccin contre la maladie de Marek (van der Heide et al., 1983) particulièrement pour les vaccins Marek HVT (utilisant l'herpès virus de la dinde comme vecteur).

Cependant, même si la vaccination des reproducteurs constitue une stratégie efficace pour la protection des poussins, cette dernière n'est assurée que dans le cas de sérotype homologues (Meanger et al., 1995)

En effet, si la souche infectante diffère trop de la souche vaccinale, on pourra observer l'apparition de signes cliniques malgré la vaccination.

4.2.2 L'adaptation de la prophylaxie face aux limites de la vaccination classique

On a vu dans la partie 3 que l'émergence de nouveaux variants entraînait la réapparition de réoviroses sévères malgré la vaccination des reproducteurs.

Le challenge de ces dernières années a été d'adapter la vaccination utilisant des souches classiques.

En effet, les souches S1133, 2408, 2177, 1733 appartiennent toutes au même sérotype et montrent 97% d'identité entre leurs séquences σ C respectives.

Les variants qui apparaissent en revanche sont distincts par leurs sérotypes, leurs génotypes et leurs antigènes.

Et σ C étant responsable de la production d'anticorps neutralisants, des modifications de cette protéine chez les variants conduisent à une inadéquation entre les anticorps neutralisants vaccinaux et les antigènes des variants. C'est la principale explication de l'échec des vaccins commerciaux (Lublin et al., 2011 ; Troxler et al., 2013 ; Sellers, 2013).

La prédiction des épitopes de σ C (avec une modélisation 3D de la protéine) pour des souches variantes et la souche S1133 a notamment permis de mettre en évidence des parties hypervariables au niveau de la tête protéique, prouvant à nouveau l'inadéquation entre les antigènes des variants et ceux des souches vaccinales (Ayalew et al., 2017).

Des alternatives à la vaccination classique ont dû alors être envisagées.

4.2.2.1 Les autovaccins

Aux Etats-Unis, des réovirus isolés sur le terrain ont été utilisés afin de fabriquer des autovaccins. Il s'agit de vaccins inactivés, avec un usage limité (Code of Federal Regulations, Title 9 §113.113).

Les autovaccins viraux sont également autorisés dans certains pays européens (Autriche, Belgique) mais pas en France (Décret n°2005-374 du 20 avril 2005).

L'importation d'autovaccins viraux peut cependant être autorisée sous certaines conditions.

Outre-Atlantique, le recours aux autovaccins est une pratique assez courante lorsque l'usage de vaccins commerciaux ne permet pas d'assurer une protection suffisante contre des réovirus émergents. La mise en place de ce type de vaccins nécessite toutefois la connaissance de

données précises sur la ou les souches, leurs génotypes et leurs prévalences dans les élevages touchés.

C'est seulement avec des test adaptés et des investigations précises (notamment sur les reproducteurs) permettant d'évaluer au mieux l'implication des variants dans les maladies observées, que la mise en œuvre de l'autovaccin fabriqué sera pertinente (Sellers, 2017).

A noter qu'un obstacle supplémentaire réside dans le fait que les autovaccins soient des vaccins inactivés. En effet, sans l'apport d'une primo-vaccination avec un virus vivant, la stimulation de l'immunité est limitée (pas de stimulation des lymphocytes B et T mémoires, de l'immunité mucosale, une durée d'immunité réduite).

Des autovaccins ont été notamment utilisés dans le but de réduire les effets du syndrome de malabsorption aux Etats-Unis. Les résultats ne sont pas concluants bien que l'apport d'un autovaccin au programme de vaccination des reproducteurs semble améliorer le gain de poids à 10 jours d'âge chez la descendance (Zavala, 2010).

4.2.2.2 Mise au point de nouveaux vaccins

La mise en place de nouveaux vaccins vivants ou recombinants, apportant un spectre de protection plus larges aux individus, constituerait un moyen de défense intéressant face à de nouveaux sérotypes et génotypes.

C'est dans cette optique que Lublin et al ont testé l'efficacité d'un vaccin contenant 4 souches d'ARV de 4 génotypes différents. Leurs résultats montraient que ce vaccin permettait de réduire l'inflammation (gonflement du coussinet plantaire) chez des individus infectés avec des variants des 4 génotypes (Lublin et al., 2011).

Un vaccin sous-unitaire contenant une partie de la protéine σ C (acides aminés 122 à 326) a également été développé. L'administration de ce vaccin recombinant par voie intramusculaire ou sous-cutanée à des poulets SPF de 14 et 28 jours d'âge permettait d'obtenir le même niveau d'anticorps anti-ARV qu'avec le virus entier (Goldenberg et al., 2016).

En théorie, ce type de vaccin pourrait donc être modifié au fur et à mesure de l'apparition de nouveaux variants par injection de nouvelles séquences de σ C.

Enfin, des vaccins vectorisés utilisant *Enterococcus faecium* et *Salmonella typhimurium* avec la protéine σ C ont également été mis à l'épreuve :

Le premier induisait une augmentation de la réponse immunitaire mucoale chez des souris. N'ayant pas été testé chez le poulet, on peut difficilement savoir si la réponse vaccinale serait identique dans l'espèce cible (Lin et al., 2012).

Le deuxième, administré oralement, n'a montré qu'une protection minimale par rapport à des animaux vaccinés avec la souche S1133 (Wan et al., 2011).

PARTIE EXPERIMENTALE

Etude épidémiologique et virologique
de cas émergents de réovirose dans le
Sud-Ouest de la France chez des poulets
Label Rouge, 2016-2018

1. Contexte

Comme on l'a vu précédemment, les réoviroses aviaires peuvent entraîner des signes cliniques variés et des pertes économiques conséquentes dans les filières avicoles.

Les réovirus sont des virus résistants dans l'environnement et ubiquistes et constituent un problème d'ordre mondial.

Les arthrites et ténosynovites virales sont les principales manifestations cliniques pour lesquelles on a pu impliquer ces agents pathogènes. Ils seraient également responsables de syndromes de malabsorption.

Ces dernières années, les publications scientifiques concernant les réovirus aviaires se sont multipliées. Ce regain d'intérêt est lié à l'émergence de nouveaux réovirus variants, échappant aux vaccinations de routine des reproducteurs et créant alors des dégâts considérables.

Dans cette étude, nous allons étudier spécifiquement l'apparition de ces nouveaux réovirus 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 2 raisons :

- Les poulets Label Rouge sont élevés sur une période plus longue que des poulets standards (respectivement 81-84 jours contre 39-42 jours). Cela favorise l'installation des lésions de ténosynovites, qui est un phénomène lent (les lésions apparaissent vers 4-7 semaines) n'ayant en général pas le temps de s'exprimer chez des animaux à durée d'élevage plus courte.
- Le poids constitue également un facteur de risque.

En effet, les poulets Label Rouge étant des animaux lourds (jusqu'à 2.4 kg pour les mâles), la pression exercée sur les tendons déjà fragilisés par l'inflammation peut aggraver les lésions (rupture tendineuse).

Nous allons nous intéresser à plusieurs cas de réoviroses décrits dans le Sud-Ouest.

Après avoir rapporté les signes cliniques et les lésions observées dans les élevages suivis, nous décrirons l'isolement, la détection du virus par PCR puis son géotypage.

2. Matériel et méthode

2.1 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'Ecole 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 avaient de 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, 7 provenaient de poules reproductrices vaccinées avec un vaccin FILAVAC Réo K12523 variant 2011.

2.2 Visite d'élevage et prélèvements réalisés

Lors des visites d'élevage, les signes cliniques étaient observés et des sujets atteints étaient prélevés pour être soumis à une autopsie à l'ENVT.

Entre 5 et 10 animaux ont été autopsiés par élevage (7 en moyenne).

En 2018, des examens supplémentaires ont été réalisés dans 3 élevages.

Des pesées ont ainsi été réalisées : pour chaque élevage, les poids de 10 individus sains et de 10 individus présentant des signes cliniques ont été relevés pour comparaison.

Dans ces 3 élevages, des écouvillons cloacaux et des prises de sang ont également été réalisées sur chaque individu. Ces prélèvements avaient pour objectif d'évaluer le tropisme viral (cloaque, sérum).

Afin d'évaluer la dispersion environnementale de l'agent pathogène, une collecte de bioaérosols avec un collecteur CORIOLIS® Micro a, de plus, été mise en place et 2 prélèvements de poussières sur les parois des bâtiments à l'aide de chiffonnettes ont été réalisés.

2.3 Autopsie et prélèvements réalisés

Après réalisation d'une autopsie complète, des prélèvements étaient réalisés sur chaque individu en vue d'un examen histologique et virologique (gaine du tendon gastrocnémien, pancréas, duodénum, jéjunum, iléon et bourse de Fabricius).

Là encore, le but était d'évaluer le tropisme viral pour ces différents organes et d'évaluer les lésions histologiques engendrées par l'infection.

Des thermographies des tendons gastrocnémiens ont également été réalisées à l'aide d'une caméra thermique afin d'illustrer l'augmentation de température créée par l'inflammation.

2.4 Analyse virologique

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

Au final, 34 prélèvements de tendons ont été mis en culture et analysés en RT-PCR réovirus aviaire.

2.4.1 Isolement du virus

Des cellules tumorales de foie de poulet (LMH) ont été mises en culture dans une plaque à 6 puits précoâtée à la gélatine 0.1% à raison de 1.10^6 cellules et 2 mL de milieu de culture (DMEM : F12 : Thermofisher Scientific). Les cellules ont été incubées une nuit à 37°C, le tapis cellulaire devant être à 70% de confluence pour infection (la confluence correspond au degré d'adhérence entre les cellules).

L'isolement du virus s'est ensuite principalement fait à partir de tendons prélevés lors des autopsies.

50mg de tendons infectés ont été broyés dans 6mL de milieu de culture à l'aide d'un mortier et quelques grammes de sable de Fontainebleau.

Les 6 mL de milieu de culture ont été prélevés et centrifugés à 5000 tr/min pendant 10 minutes à 4°C.

Après lavage des cellules LMH au PBS 1X, 200µL de broyat ont été ajouté et le tout a été mis à incuber à 37°C avec 5% de CO₂ pendant 30 minutes.

2.5 mL de milieu de culture (milieu de culture avec de la ciprofloxacine (10 µg/ml), de l'amphotéricine B (1 µg/mL) et de la BM cycline 1 (10 µg/mL)) était ajouté sur les cellules LMH et les plaques étaient placées dans l'incubateur à CO₂ à 37°C.

Après 5 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 3 cycles de congélation/décongélation au surnageant récolté au passage précédent avant l'infection des cellules LMH.

Jusqu'à 4 passages ont ainsi été réalisés, un effet cytopathogène étant d'ordinaire observé après 3 passages.

2.4.2 Transcription inverse, réaction de polymérisation en chaîne (RT-PCR) et séquençage

Pour rappel, les réovirus aviaires étant des virus à ARN double brin, il a été nécessaire de dénaturer l'ARN et de procéder à une transcription inverse.

L'ADN complémentaire ainsi obtenu a été spécifiquement amplifié par PCR dans une partie du génome définie par les amorces P1/P4 (Kant et al., 2003) :

P1 : 5'-AGTATTTGTGAGTACGATTG-3'

P4 : 5'-GGCGCCACACCTTAGGT-3'

Deux mélanges réactionnels (« mix ») ont été préparés pour la réalisation de la transcription inverse :

- Mix n°1 : 1µL de Random Hexamer (0.3µg/µl) et 1,5µl d'eau nanopure

- Mix n°2 : 4µL de Tampon 5X®, 0.5µL de Ribolock® (20U/µl), 2µL de dNTP (10mM) et 1µL de Revert Aid® (200U/µl)

10 µl d'ARN ont été extrait à partir des surnageants de culture avec le kit NucleoSpin RNA Virus (Macherey Nagel).

Ils ont été ajoutés à 2.5 µl de Mix n°1 puis chauffés à 95°C pendant 5 minutes avant de placer les tubes dans la glace.

7.5 µl de Mix n°2 ont été ensuite ajoutés au mélange et la transcription inverse a été réalisée selon le programme suivant : 10 min à 25°C, 60 min à 42°C et 10 min à 70°C.

L'ADN complémentaire obtenu était stocké à -20°C.

La réaction de PCR a été ensuite préparée.

Le Mix PCR était composé de 0.1µL de Kapa taq polymerase® (5U/µl), 1µL d'amorce P1 (10µM), 1µL d'amorce P4 (10µM), 17.4µL d'eau nanopure, 0.5µL de dNTP et 2.5µL de tampon 10X B®.

22.5 µl de ce Mix ont été ajoutés à 2.5 µl d'ADN complémentaire, centrifugés à 3000 tr/min pendant quelques secondes et la réaction de PCR a été lancée selon le programme suivant :

95°C	3 min	
95°C	30 s	x35
58°C	30 s	
72°C	1.5 min	
72°C	10 min	

Tableau 6 : Programme de la réaction de PCR. La partie en gris est reproduite sur 35 cycles

Les réactions de RT-PCR ont été réalisées dans un Thermocycleur Light Cycler 96 (Roche).

A noter que la RT-PCR a également été mise en œuvre directement avec les broyats de tendons sans passage par la mise en culture. La totalité des produits de PCR obtenus a ensuite été déposée sur un gel d'agarose à 1%. La bande a été découpée à la taille attendue de 1088 pb et purifiée pour envoi au séquençage Sanger avec les amorces P1/P4.

Un arbre phylogénétique permettant de classer le réovirus dans l'un de 5 clusters a ensuite été réalisé grâce à l'outil LIRMM (www.phylogeny.fr).

Pour finir, suite au séquençage, 2 isolats de 2018 ont fait l'objet d'une comparaison de leurs épitopes avec la souche 11-12523 (présente dans le vaccin FILAVAC Réo 2011, les individus de ces 2 lots étant issues de poules reproductrices vaccinées avec cette souche). Le mode opératoire de l'alignement des épitopes est présent dans l'Annexe 1.

3. Résultats

3.1 Signes cliniques

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%).

A noter que 5 troupeaux avaient reçu un traitement anti-inflammatoire (aspirine ou paracétamol) au moment de l'observation, ce qui pouvait biaiser l'observation des signes cliniques et réduire la proportion d'animaux visiblement atteints.

Les sujets boiteux présentaient un gonflement uni ou bilatéral du tendon gastrocnémien.

Dans l'ensemble des élevages, on remarquait également une forte hétérogénéité des lots avec des retards de croissance sévères.

3.2 Pesées

10 individus cliniques et 10 individus sains ont été pesés dans 3 élevages inclus en 2018. La différence de poids entre ces 3 lots a ainsi pu être établie.

Ces élevages ont été séparés en fonction de l'âge des lots : un lot de 53 jours, un de 67 jours et un de 70 jours.

Les données brutes des pesées sont résumées dans le Tableau 7 ci-dessous.

Lot de 53 jours				Lot de 67 jours				Lot de 70 jours			
Animal sain	Poids (kg)	Animal atteint	Poids (kg)	Animal sain	Poids (kg)	Animal atteint	Poids (kg)	Animal sain	Poids (kg)	Animal atteint	Poids (kg)
1	1,4	M1	1,2	1	2,4	M1	2	1	2,3	M1	2
2	1,2	M2	1,2	2	1,7	M2	1,4	2	2,4	M2	1,9
3	1,4	M3	1,4	3	1,4	M3	1	3	1,85	M3	2,2
4	1,4	M4	1,25	4	1,4	M4	0,8	4	2,5	M4	1,75
5	1,3	M5	0,75	5	2,4	M5	1,5	5	1,7	M5	2,25
6	1,6	M6	1,2	6	2,3	M6	1	6	2	M6	1,45
7	1,3	M7	1,2	7	1,8	M7	1,3	7	2,2	M7	2
8	1,4	M8	1,4	8	1,7	M8	0,75	8	2,3	M8	2,15
9	1,6	M9	1,05	9	1,8	M9	2,3	9	2	M9	2,3
10	1,2	M10	1,15	10	1,9	M10	1	10	2,3	M10	1,8
Moyenne	1,38	Moyenne	1,18	Moyenne	1,88	Moyenne	1,305	Moyenne	2,155	Moyenne	1,98

Tableau 7 : Résultats des pesées réalisées sur les 3 lots d'âge différents

Le logiciel R Studio a été utilisé pour comparer les poids des 3 élevages.

Un test de Shapiro a d'abord permis de déterminer si les poids de chaque élevage suivaient une loi normale.

La p-value était inférieure à 0.05 (p-value=0.047) pour le lot à 57 jours et supérieure pour les lots à 67 et 70 jours (respectivement p-value=0.14 et p-value=0.52). Seuls les poids du premier lot ne suivent pas une loi normale.

On compare donc ici des échantillons à effectif réduit et ne suivant pas tous une loi normale.

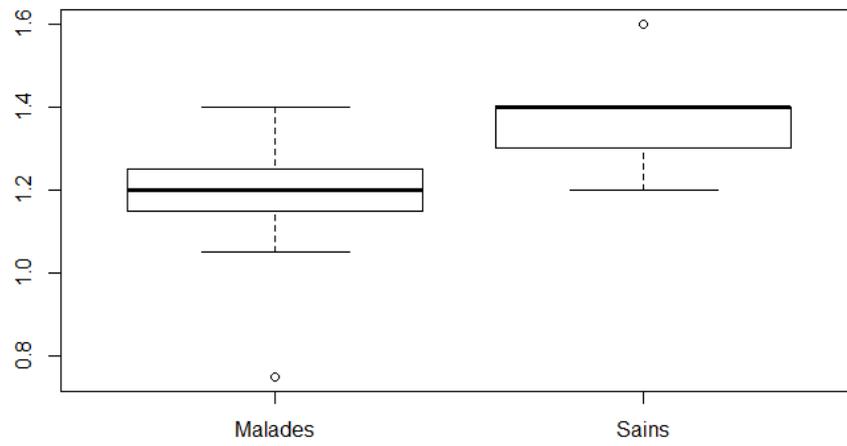
Un test de Wilcoxon est mis en œuvre pour la comparaison des poids.

Ce test montre des p-value qui sont inférieures à 0.05 pour les lots à 53 et 67 jours (respectivement p-value=0.014 et 0.015) et supérieures pour le lot de 70 jours (p-value=0.13).

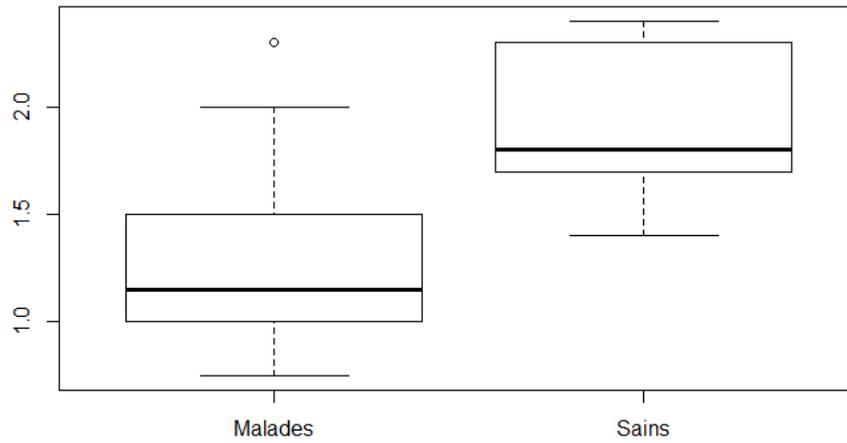
La différence de poids est donc significative entre les animaux sains et malades dans 2 élevages sur 3.

La comparaison des poids sous forme de box-plot est présentée dans la Figure 11 ci-dessous.

Comparaison des poids des animaux sains et malades - Lot de 53 jours



Comparaison des poids des animaux sains et malades - Lot de 67 jours



Comparaison des poids des animaux sains et malades - Lot de 70 jours

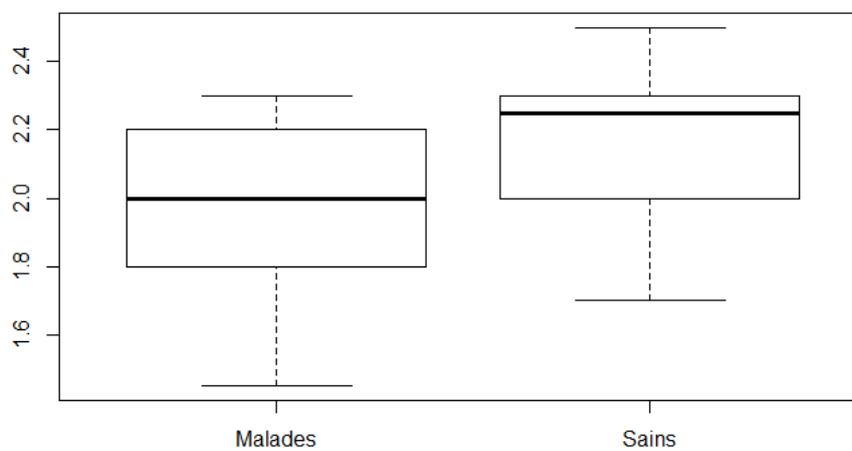


Figure 11 : Comparaison des poids (en kg) des animaux sains et malades dans 3 lots. On observe une différence significative dans les 2 premiers lots.

3.3 Autopsies

A l'autopsie, les principales lésions macroscopiques d'intérêt se situaient au niveau des tendons gastrocnémiens.

On retrouvait dans tous les lots des ténosynovites plus ou moins marquées avec des tendons gastrocnémiens œdématisés ou indurés.

Quelques sujets présentaient des signes digestifs sur l'ensemble des élevages. Des signes d'entérite hémorragique était ainsi présent dans un élevage et 1 individu sur 6 présentait une entérite dans un autre troupeau.

Des splénomégalies faisaient également partie des lésions visibles à l'autopsie.

Quelques exemples de lésions observées en autopsie sont regroupés en Annexe 2. Des thermographies de tendons atteints, réalisées durant les autopsies, sont présentées sur la Figure 12 ci-dessous

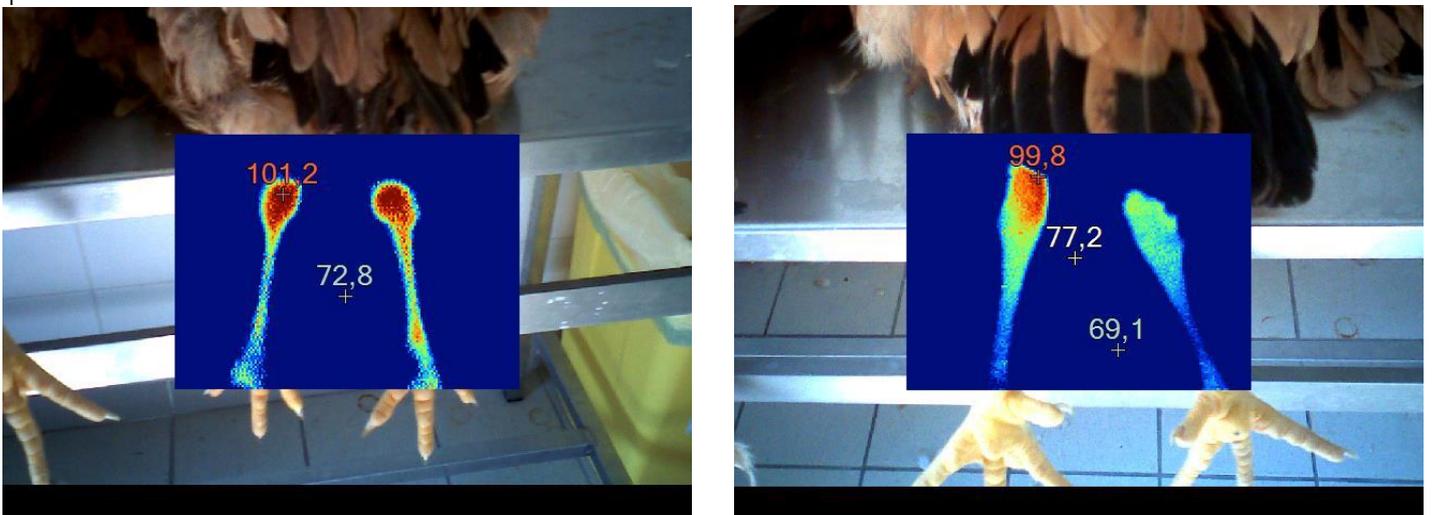


Figure 12 : Thermographies de tendons gastrocnémiens inflammés (atteinte unilatérale à droite et bilatérale sur la photo de gauche)

3.4 Examen histologique

Les résultats d'histologie ont essentiellement porté sur les lésions des tendons atteints de ténosynovites, observées en autopsie.

Les conclusions ont été similaires pour l'ensemble des échantillons analysés, avec un tableau homogène de ténosynovites chroniques marquées, fibrosantes, à dominante lymphoïde, à composante hétérophilique, compatibles avec une origine réovirale.

3.5 Analyse virologique

Sur les 34 prélèvements testés en culture cellulaire, 3 ont montré un effet cytopathogène à partir du deuxième passage, 5 à partir du troisième passage et 4 à partir du quatrième passage.

Après mise en culture, 18 échantillons se sont révélés positifs en RT-PCR (6 échantillons ne montraient pas d'ECP sur culture cellulaire mais ont tout de même été testés positifs en RT-PCR).

A noter que 3 prélèvements ont directement été testés positifs en PCR, sans passage par la culture cellulaire (RT-PCR réalisée sur les broyats de tendons).

Au total, 21 produits de PCR ont été séquencés en fonction de la protéine σ C. Au final, 18 isolats viraux ont pu être séquencé et classés dans l'un des 5 clusters.

Ainsi, parmi les 18 échantillons séquencés, 15 ont été reliés au cluster IV (12 prélèvements de 2016 et 3 de 2017) et 3 au cluster I (1 échantillon en 2016 et 2 en 2018).

Un tableau récapitulant l'ensemble de ces données est présenté en Annexe 3.

Un arbre phylogénétique a été réalisé et est présenté dans la Figure 13 ci-dessous. Les souches de 2017, appartenant au cluster IV, ne sont pas présentes sur l'arbre.

NJ 778 sites K2P 100 repl.

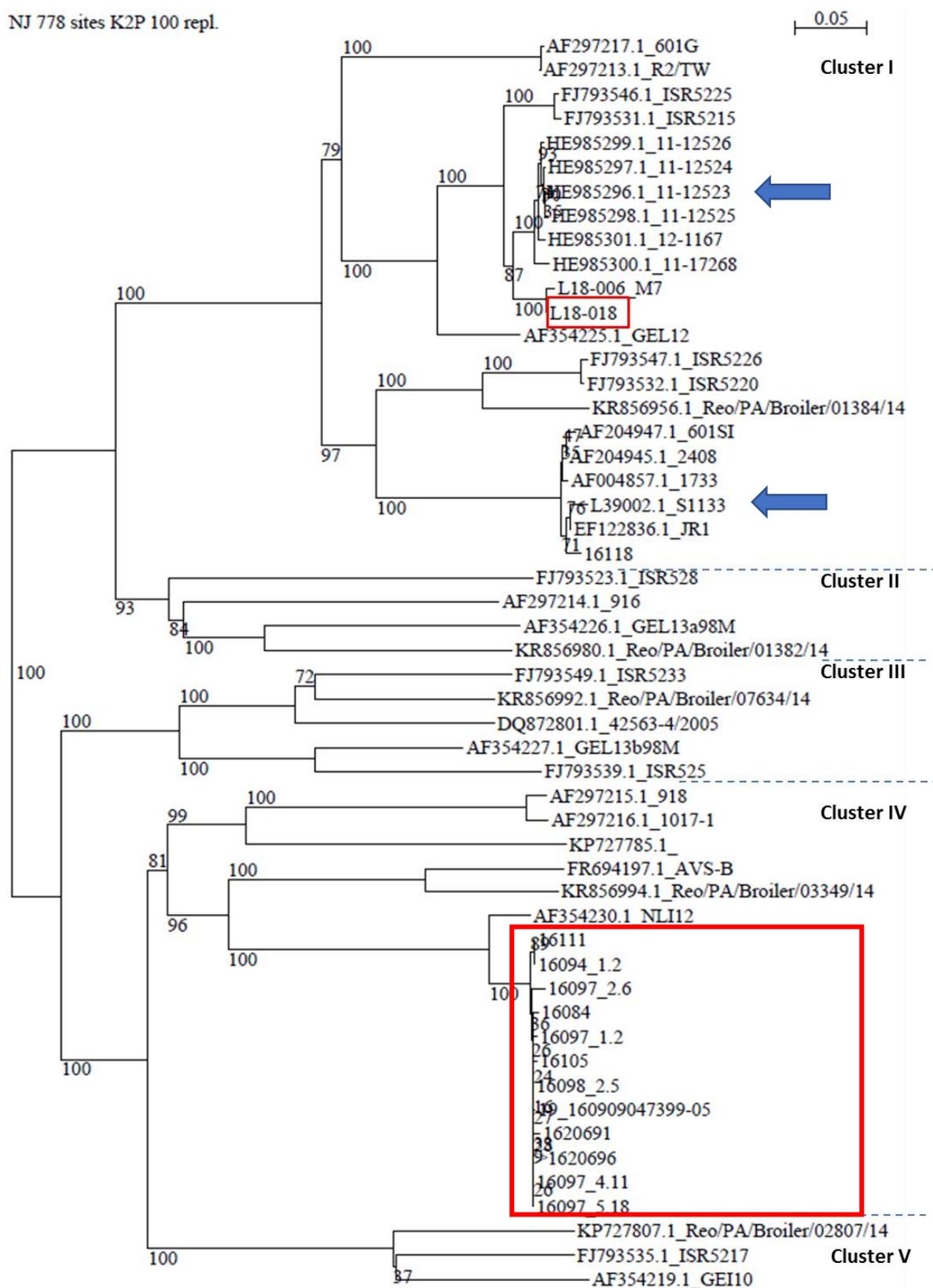


Figure 13 : Arbre phylogénétique regroupant les différents isolats de 2016 et 2018. Encadrés en rouge : isolats décrits dans ce travail. Flèches bleues : souches vaccinales

3.6 Analyse des épitopes

Les 2 séquences d'acides aminés des échantillons L18-006 et L18-018 font partie du cluster I 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 σ C de ces souches pourrait alors apporter un élément de réponse à l'apparition de signes cliniques malgré la vaccination avec une souche proche génétiquement.

En 1^{ère} tentative, l'alignement des épitopes s'est fait avec les 3 souches précédemment citées et une souche de chaque cluster (*données non montrées*).

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 est remplacé par une arginine (non chargé) dans les souches L18-006 et L18-018.
- En position 236 : une sérine (acide aminé polaire) est remplacée par une glycine (non polaire).
- En position 292 : une sérine (très petit et polaire) est remplacée par une valine (petit, aliphatique et non polaire).

Une analyse approfondie de ces épitopes est en cours.

4. Discussion

Des élevages de poulets Label Rouge du Sud-Ouest de la France ont été suivis par la clinique aviaire de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse pour des suspicions de réoviroses.

Ces épisodes, s'étant déroulés 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.

Après autopsies et examens histologiques, les lésions macroscopiques et microscopiques mettaient en évidence des ténosynovites chroniques, avec des tendons œdématiés 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 (Ayalew et al., 2017 ; Troxler et al., 2013 ; Zavala, 2010)

De plus, l'hétérogénéité des lots, les retards de croissance et les quelques lésions d'entérites observés peuvent s'expliquer par l'implication des réovirus dans le syndrome de malabsorption (Rebel et al., 2006).

La réticence des animaux à se déplacer et donc à s'alimenter, du fait de l'inflammation tendineuse, constitue également un facteur favorisant les retards de croissance.

Les poulets Label sont, de plus, particulièrement sensibles à ces affections du fait de leur longue durée d'élevage (permettant aux lésions de ténosynovites de se développer) et de leur masse corporelle importante (fragilisant davantage les tendons).

Les individus touchés avaient entre 5 et 10 semaines d'âge, période où les poulets de chair développent le plus souvent les signes cliniques.

Sur les épisodes étudiés, plusieurs foyers sont associés aux mêmes parquets de reproducteurs. Cela souligne l'importance de la voie verticale dans la transmission des réovirus aviaires (Al-Muffarej et al., 1996).

Trois élevages ont, de plus, fait l'objet de pesées dans le but d'évaluer les retards de poids engendrés par l'infection. Malgré un faible effectif, une différence de poids significative a pu être mise en évidence dans 2 lots sur 3.

Ceci illustre l'impact économique que peut avoir la réovirose, créant des retards de croissance majeurs chez les individus touchés.

Un échantillon plus conséquent aurait permis d'illustrer avec plus de précision cette différence de poids.

La comparaison de plusieurs lots atteints au même âge aurait également présenté un intérêt.

On aurait pu également étudier d'autres paramètres, comme l'impact de la maladie sur le taux de saisie à l'abattoir, comme cela a été réalisé dans d'autres études (Troxler et al., 2013).

L'isolement du virus sur cellules LMH et l'amplification du matériel génétique viral par RT-PCR a ensuite été réalisé sur 34 prélèvements de tendons issus de suivis cliniques de l'ENVT et de cliniques vétérinaires du Sud-Ouest.

Après séquençage et analyse phylogénétique, 18 prélèvements ont pu être classés dans un cluster particulier, 15 dans le cluster IV et 3 dans le cluster I.

Les isolats récoltés en 2016-2017 appartiennent principalement au cluster IV (excepté un seul prélèvement).

Bien que le génotype I soit le plus souvent impliqué dans les cas de ténosynovite, on voit ainsi émerger en Europe et dans le monde des virus génotypiquement très éloignés des clusters habituels. Ce phénomène étant en plein essor, on peut se demander quels sont les facteurs permettant l'évolution rapide de ces souches.

Il apparaît alors comme essentiel de dresser un tableau des réovirus circulants et de leur pouvoir pathogène associé. Cela pourra se faire à partir d'une surveillance globale des cas de réovirose émergents.

Ici, l'effectif d'élevage étant faible et les individus présentant globalement les mêmes signes cliniques, il a été difficile d'évaluer une éventuelle différence de pathogénicité entre les souches isolées.

Une surveillance accrue des cas d'arthrites virales à réovirus, associée à la caractérisation précise de la sévérité des lésions et au génotypage des souches impliquées pourrait permettre une meilleure distinction entre les souches.

D'autres caractéristiques virales, comme le tropisme pour des organes particuliers ou la distribution environnementale des particules virales pourrait également entrer dans le cadre de cette surveillance et permettre d'accroître les connaissances sur le virus.

Au cours de cette étude, des prélèvements ont été réalisés en élevage (écouvillons cloacaux, sérums, bioaérosols...), la charge virale pourrait être évaluée et comparée au sein de ces différents échantillons.

Un autre enjeu est la protection vaccinale contre ces souches et est illustré notamment par les trois isolats du cluster I et en particulier les 2 prélèvements de 2018 (L18-006 et L18-018).

En effet, ces réovirus ont été isolés sur des poulets issus de poules reproductrices vaccinées avec la souche 11-12523. Or, cette dernière est rattachée au génotype I et est phylogénétiquement proche des souches L18-006 et L18-018.

La question essentielle posée par cette émergence de variants porte sur la protection conférée par les vaccins commerciaux contre ces souches.

Le potentiel de mutation des réovirus concerne essentiellement la protéine σC , qui est la plus variable du génome des réovirus aviaires.

Un alignement des épitopes de la protéine σC a alors été réalisé entre les 2 souches terrains et la souche vaccinale.

L18-006 et L18-018 présentent les mêmes substitutions au niveau de 3 acides aminés par rapport à l'isolat 11-12523. Les acides aminés échangés ne présentent pas les mêmes propriétés de polarité, ce qui pourrait avoir un impact sur l'antigénicité et la susceptibilité à la neutralisation par les anticorps.

Ces quelques changements pourraient alors expliquer un échec de vaccination par une incompatibilité entre les anticorps neutralisants générés par le vaccin et les antigènes sauvages.

Aucune relation n'a pour l'instant été établie entre le génotype et la protection, il est donc difficile de faire des prédictions sur la protection croisée inter et intra-génotype.

Les souches vaccinales habituelles étant inefficaces, il apparait alors comme essentiel d'adapter continuellement la réponse vaccinale aux souches circulants sur le terrain.

L'emploi d'autovaccins viraux, solution couramment employée en Amérique du Nord et dans certains pays européens mais actuellement interdite en France, pourrait alors constituer une méthode de lutte. Le développement de nouveaux vaccins commerciaux « territoriaux », incluant des souches de réovirus variants pourrait également apporter une protection plus pertinente.

Le choix des souches employées dans ces vaccins devrait alors reposer sur l'exploitation de données collectées sur le terrain, appuyant à nouveau la pertinence d'une surveillance accrue et précise des émergences.

Au final, une connaissance approfondie des souches circulantes, de leur mécanisme d'évolution permettrait d'adapter les stratégies prophylactiques aux nouveaux variants et d'éviter les lourdes pertes économiques engendrés par des réoviroses cliniques sévères.

Cela passerait par le développement d'outils diagnostiques robustes associés à des techniques de génotypage et d'analyse des épitopes telles que celles employées dans cette étude.

Conclusion générale

Nous avons pu voir que l'infection par les réovirus aviaires constituait une problématique mondiale majeure dans l'industrie avicole.

Les réovirus sont en effet des virus non-enveloppés très résistants, ubiquistes et possédant un fort pouvoir mutagène.

Leur implication dans les arthrites et ténosynovites virales n'est plus à établir. On a notamment montré que cette maladie pouvait causer des boiteries sévères du fait de phénomènes inflammatoires marqués touchant les tendons gastrocnémiens.

La réovirose se manifeste également fréquemment par des retards de croissance et une forte hétérogénéité au sein des lots. Ils seraient alors des agents secondaires de syndrome de malabsorption en coinfection avec d'autres virus.

Un intérêt nouveau s'est manifesté pour les réovirus aviaires depuis le début des années 2000 suite à l'émergence de nouveaux réovirus causant une augmentation des foyers cliniques de réovirose, foyers qui étaient devenus rares grâce au développement de la vaccination.

Plusieurs exemples d'apparition de variants à l'échelle mondiale ont ainsi été décrits dans cette étude. Face à ces nouveaux réovirus échappant à la vaccination avec des souches usuelles, de nouvelles stratégies ont dû être mises en place.

Des méthodes de diagnostics virologiques et sérologiques poussées ont alors été développées de manière exponentielle afin d'isoler rapidement et de distinguer avec précision les souches entre elles. Les techniques de PCR en association avec le séquençage de la protéine σC permettent un isolement rapide, sensible et spécifique du réovirus ainsi qu'une caractérisation précise de la souche.

La mise en place de nouvelles stratégies de lutte est également capitale. Elles passent essentiellement par l'adaptation de la vaccination classique, devenue inefficace. Les autovaccins viraux pourraient constituer une solution provisoire mais la mise en place de nouveaux vaccins adaptés semblerait être la meilleure option.

Des investigations supplémentaires sont cependant nécessaires pour comprendre tous les mécanismes de protection croisée, d'échappement antigénique et de pathogénie.

ANNEXES

Mode opératoire

- ✓ Traduction de la séquence nucléotidique à l'aide des outils BLASTx et translate tool de EXPASY, récupérer la séquence avec transeq de EMBOSS (choisir l'ORF par rapport à une référence)

<https://web.expasy.org/translate/>

<http://www.bioinformatics.nl/emboss-explorer/>

- ✓ Faire un alignement de la séquence protéique d'intérêt avec un représentant de chaque cluster
- ✓ Rechercher les 6 épitopes visuellement
- ✓ Alignement des épitopes avec Mview de l'EMBL-EBI

<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/mview/>

- ✓ Propriétés des acides aminés mutés avec l'outil pepinfo de EMBOSS

<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/pepinfo>

- ✓ *Si besoin, prédiction de la position nucléotidique de la zone d'intérêt avec tBLASTn et reverse translate de EXPASY*

Annexe 1 : Mode opératoire de l'alignement des épitopes



**Annexe 2 : Lésions observées en autopsie : 1) Ténosynovite bilatérale œdémateuse en haut
2) Entérite congestive au centre 3) Splénomégalie en bas**

REF ENVT éventuelle	Numéro de l'animal	RT-PCR sur broyat	P1 LMH	P2 LMH	P3 LMH	P4 LMH	RT-PCR après culture	Séquençage sigma C	Commentaire
X1		POS	NEG	POS	POS	Non réalisé	POS	Cluster 4	Isolat en conservatoire
X2		NEG	NEG	POS	POS	POS	POS	Cluster 4	
X3		NEG	NEG	NEG	NEG	POS	POS	Cluster 4	Isolat en conservatoire
X4		NEG	NEG	NEG	NEG	Non réalisé	NEG	Non réalisé	
X5		NEG	NEG	NEG	NEG	Non réalisé	NEG	Non réalisé	
16-105		NEG	NEG	NEG	POS	Non réalisé	POS	Cluster 4	Isolat en conservatoire
16-111		NEG	NEG	NEG	POS	Non réalisé	POS	Cluster 4	Isolat en conservatoire
16-084		POS	Non réalisé	Cluster 4	Isolat en conservatoire				
16-118		NEG	NEG	NEG	POS	Non réalisé	POS	Cluster 1	Souche proche mais distincte de S1133
16-094	1	NEG	NEG	NEG	POS	Non réalisé	POS	Cluster 4	Isolat en conservatoire
16-094	2	NEG	NEG	NEG	NEG	Non réalisé	NEG	Non réalisé	
16-095	1	NEG	NEG	NEG	NEG	Non réalisé	NEG	Non réalisé	
16-095	2	NEG	NEG	NEG	NEG	Non réalisé	NEG	Non réalisé	
16-096	1	NEG	NEG	NEG	NEG	Non réalisé	NEG	Non réalisé	
16-096	2	NEG	NEG	NEG	NEG	Non réalisé	NEG	Non réalisé	
16-097	1	NEG	NEG	POS	POS	Non réalisé	POS	Cluster 4	Isolat en conservatoire
16-097	2	NEG	NEG	NEG	NEG	Non réalisé	POS	Cluster 4	Isolat en conservatoire
16-097	3	NEG	NEG	NEG	NEG	Non réalisé	NEG	Non réalisé	
16-097	4	NEG	NEG	NEG	NEG	Non réalisé	POS	Cluster 4	Isolat en conservatoire
16-097	5	NEG	NEG	NEG	NEG	Non réalisé	POS	Cluster 4	Isolat en conservatoire
16-098	1	NEG	NEG	NEG	NEG	Non réalisé	POS	NEG	
16-098	2	NEG	NEG	NEG	POS	Non réalisé	POS	Cluster 4	Isolat en conservatoire
16-098	4	NEG	NEG	NEG	NEG	Non réalisé	POS	NEG	
16-099	2	NEG	NEG	NEG	NEG	Non réalisé	NEG	Non réalisé	
16-099	3	NEG	NEG	NEG	NEG	Non réalisé	POS	NEG	
16-099	4	NEG	NEG	NEG	NEG	Non réalisé	NEG	Non réalisé	
17-022	1	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	POS	Cluster 4	Isolat en conservatoire
17-022	2	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	POS	Cluster 4	Isolat en conservatoire
17-022	3	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	POS	Cluster 4	Isolat en conservatoire
18-001		NEG	NEG	NEG	NEG	Non réalisé	NEG	Non réalisé	
18-002		POS	Non réalisé	Cluster 1	Isolat en conservatoire				
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	Cluster 1	Isolat en conservatoire				

Annexe 3 : Tableau récapitulatif des résultats de mise en culture cellulaire, RT-PCR et génotypage des 34 prélèvements analysés

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AL AFALEQ, A. et JONES, R.C., 1989. Pathogenicity of three turkey and three chicken reoviruses for poult and chicks with particular reference to arthritis/tenosynovitis. In : *Avian Pathology*. juillet 1989. Vol. 18, n° 3, p. 433-440. DOI 10.1080/03079458908418616.
- AL-MUFFAREJ, S. I., SAVAGE, Carol E. et JONES, R. C., 1996. Egg transmission of avian reoviruses in chickens: Comparison of a trypsin-sensitive and a trypsin-resistant strain. In : *Avian Pathology*. septembre 1996. Vol. 25, n° 3, p. 469-480. DOI 10.1080/03079459608419156.
- ASTAWA, Nyoman Mantik, 2006. Neutralization of Avian Reovirus 1091 in Chick Kidney and Vero cell Cultures by Monoclonal Antibodies against B/BC and C Proteins. In : . 2006. Vol. 22, n° 2, p. 6.
- AYALEW, Lisanework E., GUPTA, Ashish, FRICKE, Jenny, AHMED, Khawaja Ashfaque, POPOWICH, Shelly, LOCKERBIE, Betty, TIKOO, Suresh K., OJKIC, Davor et GOMIS, Susantha, 2017. Phenotypic, genotypic and antigenic characterization of emerging avian reoviruses isolated from clinical cases of arthritis in broilers in Saskatchewan, Canada. In : *Scientific Reports* [en ligne]. décembre 2017. Vol. 7, n° 1.
- BARROS, Alyne Vieira, FERNANDES, Bittencourt et ARNS, Clarice Weis, 2013. In vitro antiviral activity of seeds from *Guettarda angelica* against avian viruses. In : *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2013. p. 4.
- BARTON, Erik S, FORREST, J.Craig, CONNOLLY, Jodi L, CHAPPELL, James D, LIU, Yuan, SCHNELL, Frederick J, NUSRAT, Asma, PARKOS, Charles A et DERMODY, Terence S, 2001. Junction Adhesion Molecule Is a Receptor for Reovirus. In : *Cell*. février 2001. Vol. 104, n° 3, p. 441-451. DOI 10.1016/S0092-8674(01)00231-8.
- BENAVENTE, Javier et MARTÍNEZ-COSTAS, Jose, 2007. Avian reovirus: Structure and biology. In : *Virus Research*. février 2007. Vol. 123, n° 2, p. 105-119. DOI 10.1016/j.virusres.2006.09.005.
- BRANDARIZ-NUNEZ, A., MENAYA-VARGAS, R., BENAVENTE, J. et MARTINEZ-COSTAS, J., 2010. Avian Reovirus NS Protein Forms Homo-Oligomeric Inclusions in a Microtubule-Independent Fashion, Which Involves Specific Regions of Its C-Terminal Domain. In : *Journal of Virology*. 1 mai 2010. Vol. 84, n° 9, p. 4289-4301. DOI 10.1128/JVI.02534-09.
- BRUHN, Silke, BRUCKNER, Lukas et OTTIGER, Hans-Peter, 2005. Application of RT-PCR for the detection of avian reovirus contamination in avian viral vaccines. In : *Journal of Virological Methods*. février 2005. Vol. 123, n° 2, p. 179-186. DOI 10.1016/j.jviromet.2004.09.019.
- CATERINA, Kristen M, FRASCA, Salvatore, GIRSHICK, Theodore et KHAN, Mazhar I, 2004. Development of a multiplex PCR for detection of avian adenovirus, avian reovirus, infectious bursal disease virus, and chicken anemia virus. In : *Molecular and Cellular Probes*. octobre 2004. Vol. 18, n° 5, p. 293-298. DOI 10.1016/j.mcp.2004.04.003.
- COSTAS, C., MARTINEZ-COSTAS, J., BODELON, G. et BENAVENTE, J., 2005. The Second Open Reading Frame of the Avian Reovirus S1 Gene Encodes a Transcription-Dependent and CRM1-Independent Nucleocytoplasmic Shuttling Protein. In : *Journal of Virology*. 15 février 2005. Vol. 79, n° 4, p. 2141-2150. DOI 10.1128/JVI.79.4.2141-2150.2005.
- DAVIS, James F., KULKARNI, Arun et FLETCHER, Oscar, 2012. Myocarditis in 9- and 11-Day-Old Broiler Breeder Chicks Associated with a Reovirus Infection. In : *Avian Diseases*. décembre 2012. Vol. 56, n° 4, p. 786-790. DOI 10.1637/10267-060712-Case.1.
- DE GUSSEM, J., SWAM, H., LIEVENS, K. et DE HERDT, P., 2010. Reovirus tenosynovitis in a flock of layer breeders. In : *Avian Pathology*. juin 2010. Vol. 39, n° 3, p. 169-170. DOI 10.1080/03079451003717597.
- DECAESSTECKER, Mireille, CHARLIER, G. et MEULEMANS, G., 1986. Significance of paroviruses, enterovirus-like viruses and reoviruses in the aetiology of the chicken malabsorption syndrome. In : *Avian Pathology*. janvier 1986. Vol. 15, n° 4, p. 769-782. DOI 10.1080/03079458608436339.

- DEVANEY, Ryan, TRUDGETT, James, TRUDGETT, Alan, MEHARG, Caroline et SMYTH, Victoria, 2016. A metagenomic comparison of endemic viruses from broiler chickens with runting-stunting syndrome and from normal birds. In : *Avian Pathology*. novembre 2016. Vol. 45, n° 6, p. 616-629. DOI 10.1080/03079457.2016.1193123.
- DUTTA, S. K. et POMEROY, B. S., 1967. Isolation and Characterization of an Enterovirus from Baby Chicks Having an Enteric Infection II. Physical and Chemical Characteristics and Ultrastructure. In : *Avian Diseases*. février 1967. Vol. 11, n° 1, p. 9. DOI 10.2307/1588321.
- ENDO-MUNOZ, Liliana B., 1990. A western blot to detect antibody to avian reovirus. In : *Avian Pathology*. juillet 1990. Vol. 19, n° 3, p. 477-487. DOI 10.1080/03079459008418701.
- GERSHOWITZ, Alan et WOOLEY, Richard E., 1973. Characterization of Two Reoviruses Isolated from Turkeys with Infectious Enteritis. In : *Avian Diseases*. avril 1973. Vol. 17, n° 2, p. 406. DOI 10.2307/1589225.
- GIAMBRONE, J. J., DORMITORIO, T. et LOCKABY, S. B., 1992. Coarse-Spray Immunization of One-Day-Old Broilers against Enteric Reovirus Infections. In : *Avian Diseases*. avril 1992. Vol. 36, n° 2, p. 364. DOI 10.2307/1591514.
- GIAMBRONE, J. J. et HATHCOCK, T. L., 1991. Efficacy of Coarse-Spray Administration of a Reovirus Vaccine in Young Chickens. In : *Avian Diseases*. janvier 1991. Vol. 35, n° 1, p. 204. DOI 10.2307/1591315.
- GIAMBRONE, J. J., HATHCOCK, T. L. et LOCKABY, S. B., 1991. Effect of a Live Reovirus Vaccine on Reproductive Performance of Broiler Breeder Hens and Development of Viral Tenosynovitis in Progeny. In : *Avian Diseases*. avril 1991. Vol. 35, n° 2, p. 380. DOI 10.2307/1591193.
- GOLDENBERG, Dana, LUBLIN, Avishai, ROSENBLUTH, Ezra, HELLER, E. Dan et PITCOVSKI, Jacob, 2011. Differentiating infected from vaccinated animals, and among virulent prototypes of reovirus. In : *Journal of Virological Methods*. octobre 2011. Vol. 177, n° 1, p. 80-86. DOI 10.1016/j.jviromet.2011.06.023.
- GOLDENBERG, Dana, LUBLIN, Avishai, ROSENBLUTH, Ezra, HELLER, E. Dan et PITCOVSKI, Jacob, 2016. Optimized polypeptide for a subunit vaccine against avian reovirus. In : *Vaccine*. juin 2016. Vol. 34, n° 27, p. 3178-3183. DOI 10.1016/j.vaccine.2016.04.036.
- GOLDENBERG, Dana, PASMANK-CHOR, Metsada, PIRAK, Michael, KASS, Nava, LUBLIN, Avishai, YEHEKEL, Adva, HELLER, Dan et PITCOVSKI, Jacob, 2010. Genetic and antigenic characterization of sigma C protein from avian reovirus. In : *Avian Pathology*. juin 2010. Vol. 39, n° 3, p. 189-199. DOI 10.1080/03079457.2010.480969.
- GONZALEZ-LOPEZ, C., 2003. Evidence that avian reovirus sigmaA protein is an inhibitor of the double-stranded RNA-dependent protein kinase. In : *Journal of General Virology*. 1 juin 2003. Vol. 84, n° 6, p. 1629-1639. DOI 10.1099/vir.0.19004-0.
- GOODWIN, Mark A., DAVIS, James F. et PLAYER, E. Craig, 1993. Reovirus-Associated Enteritis in Georgia Broiler Chicks. In : *Avian Diseases*. janvier 1993. Vol. 37, n° 1, p. 229. DOI 10.2307/1591480.
- GUARDADO CALVO, Pablo, FOX, Gavin C., HERMO PARRADO, X. Lois, LLAMAS-SAIZ, Antonio L., COSTAS, Celina, MARTÍNEZ-COSTAS, José, BENAVENTE, Javier et VAN RAAIJ, Mark J., 2005. Structure of the Carboxy-terminal Receptor-binding Domain of Avian Reovirus Fibre SigmaC. In : *Journal of Molecular Biology*. novembre 2005. Vol. 354, n° 1, p. 137-149. DOI 10.1016/j.jmb.2005.09.034.
- GUO, Kejun, DORMITORIO, Teresa V., OU, Shan-Chia et GIAMBRONE, Joseph J., 2011. Development of TaqMan real-time RT-PCR for detection of avian reoviruses. In : *Journal of Virological Methods*. octobre 2011. Vol. 177, n° 1, p. 75-79. DOI 10.1016/j.jviromet.2011.06.022.
- GUY, James S., LEVY, Michael G., LEY, David H., BARNES, H. John et GERIG, Thomas M., 1988. Interaction of Reovirus and *Cryptosporidium baileyi* in Experimentally Infected Chickens. In : *Avian Diseases*. juillet 1988. Vol. 32, n° 3, p. 381. DOI 10.2307/1590901.

- HEDAYATI ET AL., 2013. Detection of avian reoviruses causing tenosynovitis in breeder flocks in Iran by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and restriction enzyme fragment length polymorphism (RFLP). In : . 2013. p. 9.
- HEGGEN-PEAY, C.L., 2002. Isolation of a Reovirus from Poult Enteritis and Mortality Syndrome and Its Pathogenicity in Turkey Poults. In : *Avian Diseases*. 2002. Vol. 46, n° 1, p. 32-47.
- HERDT, P. De, DUCATELLE, R., UYTTEBROEK, E., HERMANS, J., SNEEP, A. et TORBEYNS, R., 1999. Reovirus Serology in Broiler Parents and Their Progeny and Its Correlation with Performance. In : *Avian Diseases*. avril 1999. Vol. 43, n° 2, p. 271. DOI 10.2307/1592617.
- HILL, J. E., ROWLAND, G. N., LATIMER, K. S. et BROWN, J., 1989. Effects of Cyclosporine A on Reovirus-Infected Broilers. In : *Avian Diseases*. janvier 1989. Vol. 33, n° 1, p. 86. DOI 10.2307/1591072.
- HILL, J. E., ROWLAND, G. N., STEFFENS, W. L. et ARD, M. B., 1989. Ultrastructure of the Gastrocnemius Tendon and Sheath from Broilers Infected with Reovirus. In : *Avian Diseases*. janvier 1989. Vol. 33, n° 1, p. 79. DOI 10.2307/1591071.
- HSIAO, Joseph, MARTÍNEZ-COSTAS, José, BENAVENTE, Javier et VAKHARIA, Vikram N., 2002. Cloning, Expression, and Characterization of Avian Reovirus Guanylyltransferase. In : *Virology*. mai 2002. Vol. 296, n° 2, p. 288-299. DOI 10.1006/viro.2002.1427.
- HUANG, Li, XIE, Zhixun, XIE, Liji, DENG, Xianwen, XIE, Zhiqin, LUO, Sisi, HUANG, Jiaoling, ZENG, Tingting et FENG, Jiaxun, 2015. A duplex real-time PCR assay for the detection and quantification of avian reovirus and Mycoplasma synoviae. In : *Virology Journal*. 2015. Vol. 12, n° 1, p. 22. DOI 10.1186/s12985-015-0255-y.
- HUANG, Wei-Ru, CHIU, Hung-Chuan, LIAO, Tsai-Ling, CHUANG, Kuo-Pin, SHIH, Wing-Ling et LIU, Hung-Jen, 2015. Avian Reovirus Protein p17 Functions as a Nucleoporin Tpr Suppressor Leading to Activation of p53, p21 and PTEN and Inactivation of PI3K/AKT/mTOR and ERK Signaling Pathways. In : YAN, Chunhong (éd.), *PLOS ONE*. 5 août 2015. Vol. 10, n° 8, p. e0133699. DOI 10.1371/journal.pone.0133699.
- IDE, P R, 1982. Avian Reovirus Antibody Assay by Indirect Immunofluorescence Using Plastic Microculture Plates. In : . 1982. p. 4.
- INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES et KING, Andrew M. Q. (éd.), 2012. *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. London ; Waltham, MA : Academic Press. ISBN 978-0-12-384684-6. QR394 .I58 2012
- ISLAM, M.R. et JONES, R.C., 1988. An enzyme-linked immunosorbent assay for measuring antibody titre against avian reovirus using a single dilution of serum. In : *Avian Pathology*. janvier 1988. Vol. 17, n° 2, p. 411-425. DOI 10.1080/03079458808436459.
- JONES, R., 1976. Reoviruses from chickens with hydropericardium. In : *Veterinary Record*. 4 décembre 1976. Vol. 99, n° 23, p. 458-458. DOI 10.1136/vr.99.23.458-a.
- JONES, R. C., 2000. Avian reovirus infections. In : *Revue Scientifique et Technique-Office International des Epizooties*. 2000. Vol. 19, n° 2, p. 614-619.
- JONES, R. C. (éd.), 2013. *Diseases of poultry*. 13. ed. Ames, Iowa : Wiley. ISBN 978-0-470-95899-5.
- JONES, R. C., AL-AFALEQ, A., SAVAGE, Carol E. et ISLAM, M. R., 1994. Early pathogenesis in chicks of infection with a trypsin-sensitive avian reovirus. In : *Avian Pathology*. décembre 1994. Vol. 23, n° 4, p. 683-692. DOI 10.1080/03079459408419037.
- JONES, R.C. et GEORGIU, K., 1984. Reovirus-induced tenosynovitis in chickens the influence of age at infection. In : *Avian Pathology*. juillet 1984. Vol. 13, n° 3, p. 441-457. DOI 10.1080/03079458408418546.

- JONES, R.C. et GUNERATNE, J.R.M., 1984. The pathogenicity of some avian reoviruses with particular reference to tenosynovitis. In : *Avian Pathology*. avril 1984. Vol. 13, n° 2, p. 173-189. DOI 10.1080/03079458408418522.
- KANG, Kyung-II, EL-GAZZAR, Mohamed, SELLERS, Holly S., DOREA, Fernanda, WILLIAMS, Susan M., KIM, Taejoong, COLLETT, Stephen et MUNDT, Egbert, 2012. Investigation into the aetiology of runting and stunting syndrome in chickens. In : *Avian Pathology*. février 2012. Vol. 41, n° 1, p. 41-50. DOI 10.1080/03079457.2011.632402.
- KANT, Arie, BALK, Francis, BORN, Leontine, VAN ROOZELAAR, Dirk, HEIJMANS, Jos, GIELKENS, Arno et TER HUURNE, Agnes, 2003. Classification of Dutch and German avian reoviruses by sequencing the C protein. In : *Veterinary Research*. mars 2003. Vol. 34, n° 2, p. 203-212. DOI 10.1051/vetres:2002067.
- KE, Guan M., CHENG, Hsueh L., KE, Liang Y., JI, Wen T., CHULU, Julius L.C., LIAO, Ming H., CHANG, Tien J. et LIU, Hung J., 2006. Development of a quantitative Light Cycler real-time RT-PCR for detection of avian reovirus. In : *Journal of Virological Methods*. avril 2006. Vol. 133, n° 1, p. 6-13. DOI 10.1016/j.jviromet.2005.09.011.
- KIBENGE, F. S. B. et DHILLON, A. S., 1987. A Comparison of the Pathogenicity of Four Avian Reoviruses in Chickens. In : *Avian Diseases*. janvier 1987. Vol. 31, n° 1, p. 39. DOI 10.2307/1590769.
- KIBENGE, F. S. B., JONES, R. C. et SAVAGE, Carol E., 1987. Effects of experimental immunosuppression on reovirus-induced tenosynovitis in light-hybrid chickens. In : *Avian Pathology*. janvier 1987. Vol. 16, n° 1, p. 73-92. DOI 10.1080/03079458708436354.
- KORT, Ymene Hellal, BOUROGÂA, Hager, GRIBAA, Latifa, HASSEN, Jihene et GHRAM, Abdelgelil, 2015. Genotyping and Classification of Tunisian Strains of Avian Reovirus using RT-PCR and RFLP Analysis. In : *Avian Diseases*. mars 2015. Vol. 59, n° 1, p. 14-19. DOI 10.1637/10879-060414-Reg.1.
- LABRADA, L., BODELON, G., VINUELA, J. et BENAVENTE, J., 2002. Avian Reoviruses Cause Apoptosis in Cultured Cells: Viral Uncoating, but Not Viral Gene Expression, Is Required for Apoptosis Induction. In : *Journal of Virology*. 15 août 2002. Vol. 76, n° 16, p. 7932-7941. DOI 10.1128/JVI.76.16.7932-7941.2002.
- LENZ, Stephen D., HOERR, Frederic J., ELLIS, Alfred C., TOIVIO-KINNUCAN, Maria A. et YU, Maria, 1998. Gastrointestinal Pathogenicity of Adenoviruses and Reoviruses Isolated from Broiler Chickens in Alabama. In : *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. avril 1998. Vol. 10, n° 2, p. 145-151. DOI 10.1177/104063879801000205.
- LEVISOHN, Sharon, GUR-LAVIE, A. et WEISMAN, J., 1980. Infectious synovitis in Turkeys: Isolation of tenosynovitis virus-like agent. In : *Avian Pathology*. janvier 1980. Vol. 9, n° 1, p. 1-4. DOI 10.1080/03079458008418380.
- LIN, Kuan-Hsun, HSU, Ai-Ping, SHIEN, Jui-Hung, CHANG, Tien-Jye, LIAO, Jiunn-Wang, CHEN, Jeng-Rung, LIN, Chuen-Fu et HSU, Wei-Li, 2012. Avian reovirus sigma C enhances the mucosal and systemic immune responses elicited by antigen-conjugated lactic acid bacteria. In : *Vaccine*. juillet 2012. Vol. 30, n° 33, p. 5019-5029. DOI 10.1016/j.vaccine.2012.04.043.
- LIU, Hung J., KUO, Liam C., HU, Yu C., LIAO, Ming H. et LIEN, Yi Y., 2002. Development of an ELISA for detection of antibodies to avian reovirus in chickens. In : *Journal of Virological Methods*. avril 2002. Vol. 102, n° 1-2, p. 129-138. DOI 10.1016/S0166-0934(02)00010-1.
- LIU, Hung Jen, GIAMBRONE, Joseph J. et NIELSEN, Brent L., 1997. Molecular characterization of avian reoviruses using nested PCR and nucleotide sequence analysis. In : *Journal of Virological Methods*. mai 1997. Vol. 65, n° 2, p. 159-167. DOI 10.1016/S0166-0934(97)02199-X.
- LIU, Hung-Jen, LIN, Ping-Yuan, LEE, Jeng-Woei, HSU, Hsue-Yin et SHIH, Wen-Ling, 2005. Retardation of cell growth by avian reovirus p17 through the activation of p53 pathway. In : *Biochemical and Biophysical Research Communications*. octobre 2005. Vol. 336, n° 2, p. 709-715. DOI 10.1016/j.bbrc.2005.08.149.

- LOSTALÉ-SEIJO, Irene, MARTÍNEZ-COSTAS, José et BENAVENTE, Javier, 2016. Interferon induction by avian reovirus. In : *Virology*. janvier 2016. Vol. 487, p. 104-111. DOI 10.1016/j.virol.2015.10.009.
- LU, Huaguang, TANG, Yi, DUNN, Patricia A., WALLNER-PENDLETON, Eva A., LIN, Lin et KNOLL, Eric A., 2015. Isolation and molecular characterization of newly emerging avian reovirus variants and novel strains in Pennsylvania, USA, 2011–2014. In : *Scientific Reports*. 15 octobre 2015. Vol. 5, p. 14727. DOI 10.1038/srep14727.
- LUBLIN, Avishai, GOLDENBERG, Dana, ROSENBLUTH, Ezra, HELLER, E. Dan et PITCOVSKI, Jacob, 2011. Wide-range protection against avian reovirus conferred by vaccination with representatives of four defined genotypes. In : *Vaccine*. novembre 2011. Vol. 29, n° 47, p. 8683-8688. DOI 10.1016/j.vaccine.2011.08.114.
- LUPINI, C., CECCHINATO, M., SCAGLIARINI, A., GRAZIANI, R. et CATELLI, E., 2009. In vitro antiviral activity of chestnut and quebracho woods extracts against avian reovirus and metapneumovirus. In : *Research in Veterinary Science*. décembre 2009. Vol. 87, n° 3, p. 482-487. DOI 10.1016/j.rvsc.2009.04.007.
- MALKINSON, M., PERK, K. et WEISMAN, Y., 1981. Reovirus infection of young muscovy ducks (*Cairina Moschata*). In : *Avian Pathology*. octobre 1981. Vol. 10, n° 4, p. 433-440. DOI 10.1080/03079458108418493.
- MARTÍNEZ-COSTAS, JOSE, GRANDE, ANA, VARELA, RUBEN, GARCIA-MARTINEZ, CONCEPCIO N et BENAVENTE, JAVIER, 1997. Protein Architecture of Avian Reovirus S1133 and Identification of the Cell Attachment Protein. In : *J. VIROL*. 1997. Vol. 71, p. 6.
- MARTINEZ-COSTAS, JOSE, PEZ, CLAUDIA GONZA LEZ-LO, VAKHARIA, VIKRAM N et BENAVENTE, JAVIER, 2000. Possible Involvement of the Double-Stranded RNA-Binding Core Protein □A in the Resistance of Avian Reovirus to Interferon. In : *J. VIROL*. 2000. Vol. 74, p. 8.
- MEANGER, J, WICKRAMASINGHE, R., ENRIQUEZ, C. E., ROBERTSON, M. D. et WILCOX, G. E., 1995. Type-specific antigenicity of avian reoviruses. In : *Avian Pathology*. mars 1995. Vol. 24, n° 1, p. 121-134. DOI 10.1080/03079459508419053.
- MEANGER, J., WICKRAMASINGHE, R., ENRIQUEZ, Ce et WILCOX, Ge, 1997. Immune response to avian reovirus in chickens and protection against experimental infection. In : *Australian Veterinary Journal*. juin 1997. Vol. 75, n° 6, p. 428-432. DOI 10.1111/j.1751-0813.1997.tb14348.x.
- MENENDEZ, N. A., CALNEK, B. W. et COWEN, B. S., 1975. Experimental Egg-Transmission of Avian Reovirus. In : *Avian Diseases*. janvier 1975. Vol. 19, n° 1, p. 104. DOI 10.2307/1588960.
- MOR, Sunil K., BEKELE, Aschalew Z., SHARAFELDIN, Tamer A., PORTER, Robert E. et GOYAL, Sagar M., 2015. Efficacy of Five Commonly Used Disinfectants Against Turkey Arthritis Reovirus. In : *Avian Diseases*. mars 2015. Vol. 59, n° 1, p. 71-73. DOI 10.1637/10880-060614-Reg.
- MOR, Sunil K., SHARAFELDIN, Tamer A., PORTER, Robert E., ZIEGLER, Andre, PATNAYAK, Devi P. et GOYAL, Sagar M., 2013. Isolation and Characterization of a Turkey Arthritis Reovirus. In : *Avian Diseases*. mars 2013. Vol. 57, n° 1, p. 97-103. DOI 10.1637/10353-090712-Reg.1.
- MUKIIBI-MUKA, G. et JONES, R. C., 1999. Local and systemic IgA and IgG responses of chicks to avian reoviruses: Effects of age of chick, route of infection and virus strain. In : *Avian Pathology*. février 1999. Vol. 28, n° 1, p. 54-60. DOI 10.1080/03079459995046.
- O'HARA, D., PATRICK, M., CEPICA, D., COOMBS, K. M. et DUNCAN, R., 2001. Avian Reovirus Major - Class Outer Capsid Protein Influences Efficiency of Productive Macrophage Infection in a Virus Strain-Specific Manner. In : *Journal of Virology*. 1 juin 2001. Vol. 75, n° 11, p. 5027-5035. DOI 10.1128/JVI.75.11.5027-5035.2001.
- PALYA, Vilmos, GLÁVITS, Róbert, DOBOS-KOVÁCS, Mihály, IVANICS, Éva, NAGY, Eörsné, BÁNYAI, Krisztián, SZÜCS, György, DÁ, Ádám et BENKÖ, Mária, 2003. Reovirus identified as cause of disease in young geese. In : *Avian Pathology*. avril 2003. Vol. 32, n° 2, p. 129-138. DOI 10.1080/030794502100007187.

- PERTILE, Terence L., KARACA, Kemal, WALSER, Mary M. et SHARMA, Jagdev M., 1996. Suppressor macrophages mediate depressed lymphoproliferation in chickens infected with avian reovirus. In : *Veterinary Immunology and Immunopathology*. septembre 1996. Vol. 53, n° 1-2, p. 129-145. DOI 10.1016/0165-2427(96)05555-9.
- RAU, W. E., VAN DER HEIDE, L., KALBAC, M. et GIRSHICK, T., 1980. Onset of Progeny Immunity against Viral Arthritis/Tenosynovitis after Experimental Vaccination of Parent Breeder Chickens and Cross-Immunity against Six Reovirus Isolates. In : *Avian Diseases*. juillet 1980. Vol. 24, n° 3, p. 648. DOI 10.2307/1589802.
- READ, Jolene, CLANCY, Eileen K., SARKER, Muzaddid, DE ANTUENO, Roberto, LANGELAAN, David N., PARMAR, Hiren B., SHIN, Kyungsoo, RAINEY, Jan K. et DUNCAN, Roy, 2015. Reovirus FAST Proteins Drive Pore Formation and Syncytiogenesis Using a Novel Helix-Loop-Helix Fusion-Inducing Lipid Packing Sensor. In : DUTCH, Rebecca Ellis (éd.), *PLOS Pathogens*. 10 juin 2015. Vol. 11, n° 6, p. e1004962. DOI 10.1371/journal.ppat.1004962.
- REBEL, J.M.J., BALK, F.R.M., POST, J., VAN HEMERT, S., ZEKARIAS, B. et STOCKHOFE, N., 2006. Malabsorption syndrome in broilers. In : *World's Poultry Science Journal*. mars 2006. Vol. 62, n° 01, p. 17-30. DOI 10.1079/WPS200481.
- REKIK, M. R., SILIM, A. et BERNIER, G., 1991. Serological and pathogenic characterization of avian reoviruses isolated in Quebec. In : *Avian Pathology*. décembre 1991. Vol. 20, n° 4, p. 607-617. DOI 10.1080/03079459108418800.
- ROBERTSON, M.D. et WILCOX, G.E., 1984. Serological characteristics of avian reoviruses of Australian origin. In : *Avian Pathology*. juillet 1984. Vol. 13, n° 3, p. 585-594. DOI 10.1080/03079458408418557.
- RODRÍGUEZ-GRILLE, Javier, BUSCH, Lisa K., MARTÍNEZ-COSTAS, José et BENAVENTE, Javier, 2014. Avian reovirus-triggered apoptosis enhances both virus spread and the processing of the viral nonstructural muNS protein. In : *Virology*. août 2014. Vol. 462-463, p. 49-59. DOI 10.1016/j.virol.2014.04.039.
- ROESSLER, D. E. et ROSENBERGER, J. K., 1989. In vitro and in vivo Characterization of Avian Reoviruses. III. Host Factors Affecting Virulence and Persistence. In : *Avian Diseases*. juillet 1989. Vol. 33, n° 3, p. 555. DOI 10.2307/1591120.
- ROSENBERGER, J. K., STERNER, F. J., BOTTS, S., LEE, K. P. et MARGOLIN, A., 1989. In vitro and in vivo Characterization of Avian Reoviruses. I. Pathogenicity and Antigenic Relatedness of Several Avian Reovirus Isolates. In : *Avian Diseases*. juillet 1989. Vol. 33, n° 3, p. 535. DOI 10.2307/1591118.
- RUFF, M. D. et ROSENBERGER, J. K., 1985. Concurrent Infections with Reoviruses and Coccidia in Broilers. In : *Avian Diseases*. avril 1985. Vol. 29, n° 2, p. 465. DOI 10.2307/1590508.
- SALSMAN, J., TOP, D., BOUTILIER, J. et DUNCAN, R., 2005. Extensive Syncytium Formation Mediated by the Reovirus FAST Proteins Triggers Apoptosis-Induced Membrane Instability. In : *Journal of Virology*. 1 juillet 2005. Vol. 79, n° 13, p. 8090-8100. DOI 10.1128/JVI.79.13.8090-8100.2005.
- SAVAGE, Carol E. et JONES, R. C., 2003. The survival of avian reoviruses on materials associated with the poultry house environment. In : *Avian Pathology*. août 2003. Vol. 32, n° 4, p. 417-423. DOI 10.1080/0307945031000121176.
- SELLERS, Holly, 2013. Update on Variant Avian Reoviruses Isolated from Clinical Cases of Viral Arthritis/Tenosynovitis in Broilers. In : . 2013. p. 6.
- SELLERS, Holly S., 2017. Current limitations in control of viral arthritis and tenosynovitis caused by avian reoviruses in commercial poultry. In : *Veterinary Microbiology*. juillet 2017. Vol. 206, p. 152-156. DOI 10.1016/j.vetmic.2016.12.014.

SHARAFELDIN, Tamer A., MOR, Sunil K., BEKELE, Aschalew Z., VERMA, Harsha, GOYAL, Sagar M. et PORTER, Robert E., 2014. The role of avian reoviruses in turkey tenosynovitis/arthritis. In : *Avian Pathology*. 4 juillet 2014. Vol. 43, n° 4, p. 371-378. DOI 10.1080/03079457.2014.940496.

SHARAFELDIN, Tamer A., MOR, Sunil K., VERMA, Harsha, BEKELE, Aschalew Z., ISMAGILOVA, Liliya, GOYAL, Sagar M. et PORTER, Robert E., 2015. Pathogenicity of newly emergent turkey arthritis reoviruses in chickens. In : *Poultry Science*. 1 octobre 2015. Vol. 94, n° 10, p. 2369-2374. DOI 10.3382/ps/pev233.

SHIEN, J.H, YIN, H.S et LEE, L.H, 2000. An enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibody to avian reovirus by using protein σ B as the coating antigen. In : *Research in Veterinary Science*. octobre 2000. Vol. 69, n° 2, p. 107-112. DOI 10.1053/rvsc.2000.0414.

SHIH, Wen L., HSU, Hsiao W., LIAO, Ming H., LEE, Long H. et LIU, Hung J., 2004. Avian reovirus σ C protein induces apoptosis in cultured cells. In : *Virology*. mars 2004. Vol. 321, n° 1, p. 65-74. DOI 10.1016/j.virol.2003.12.004.

SHMULEVITZ, M., CORCORAN, J., SALSMAN, J. et DUNCAN, R., 2004. Cell-Cell Fusion Induced by the Avian Reovirus Membrane Fusion Protein Is Regulated by Protein Degradation. In : *Journal of Virology*. 1 juin 2004. Vol. 78, n° 11, p. 5996-6004. DOI 10.1128/JVI.78.11.5996-6004.2004.

SONGSEEM, Th, ZEKARIAS, B., VAN ROOZELAAR, D. J., KOK, R. S., POL, J. M A., PIJPERS, A. et TER HUURNE, A. A H. M., 2002. Experimental Reproduction of Malabsorption Syndrome with Different Combinations of Reovirus, Escherichia coli, and Treated Homogenates Obtained from Broilers. In : *Avian Diseases*. janvier 2002. Vol. 46, n° 1, p. 87-94. DOI 10.1637/0005-2086(2002)046[0087:EROMSW]2.0.CO;2.

SONGSEEM, Thaweesak, VAN ROOZELAAR, Dirk, KANT, Arie, POL, Jan, PIJPERS, Anton et AGNES TER HUURNE, 2003. Enteropathogenicity of Dutch and German avian reoviruses in SPF white leghorn chickens and broilers. In : *Veterinary Research*. mai 2003. Vol. 34, n° 3, p. 285-295. DOI 10.1051/vetres:2003004.

STYŚ-FIJOŁ, Natalia, KOZDRUŃ, Wojciech et CZEKAJ, Hanna, 2017. Detection of avian reoviruses in wild birds in Poland. In : *Journal of Veterinary Research*. 26 septembre 2017. Vol. 61, n° 3, p. 239-245. DOI 10.1515/jvetres-2017-0033.

TAKASE, K., FUJIKAWA, H. et YAMADA, S., 1996. Correlation between neutralizing antibody titre and protection from tenosynovitis in avian reovirus infections. In : *Avian Pathology*. décembre 1996. Vol. 25, n° 4, p. 807-815. DOI 10.1080/03079459608419183.

TANG, Yi, LIN, Lin, SEBASTIAN, Aswathy et LU, Huaguang, 2016. Detection and characterization of two co-infection variant strains of avian orthoreovirus (ARV) in young layer chickens using next-generation sequencing (NGS). In : *Scientific Reports*. 19 avril 2016. Vol. 6, p. 24519. DOI 10.1038/srep24519.

TOURIS-OTERO, F., 2005. Characterization of the nucleic acid-binding activity of the avian reovirus non-structural protein NS. In : *Journal of General Virology*. 1 avril 2005. Vol. 86, n° 4, p. 1159-1169. DOI 10.1099/vir.0.80491-0.

TOURÍS-OTERO, Fernando, CORTEZ-SAN MARTÍN, Marcelo, MARTÍNEZ-COSTAS, José et BENAVENTE, Javier, 2004. Avian Reovirus Morphogenesis Occurs Within Viral Factories and Begins with the Selective Recruitment of σ NS and λ A to μ NS Inclusions. In : *Journal of Molecular Biology*. août 2004. Vol. 341, n° 2, p. 361-374. DOI 10.1016/j.jmb.2004.06.026.

TROXLER, S., RIGOMIER, P., BILIC, I., LIEBHART, D., PROKOFIEVA, I., ROBINEAU, B. et HESS, M., 2013. Identification of a new reovirus causing substantial losses in broiler production in France, despite routine vaccination of breeders. In : *Veterinary Record*. 25 mai 2013. Vol. 172, n° 21, p. 556-556. DOI 10.1136/vr.101262.

- VAN DE ZANDE, Saskia et KUHN, Eva-Maria, 2007. Central nervous system signs in chickens caused by a new avian reovirus strain: A pathogenesis study. In : *Veterinary Microbiology*. février 2007. Vol. 120, n° 1-2, p. 42-49. DOI 10.1016/j.vetmic.2006.10.024.
- VAN DER HEIDE, L., 1977. Viral arthritis/tenosynovitis: A review. In : *Avian Pathology*. janvier 1977. Vol. 6, n° 4, p. 271-284. DOI 10.1080/03079457708418237.
- VAN DER HEIDE, L., KALBAC, M. et HALL, W. C., 1976. Infectious Tenosynovitis (Viral Arthritis): Influence of Maternal Antibodies on the Development of Tenosynovitis Lesions after Experimental Infection by Day-Old Chickens with Tenosynovitis Virus. In : *Avian Diseases*. octobre 1976. Vol. 20, n° 4, p. 641. DOI 10.2307/1589443.
- VAN DER HEIDE, L., KALBAC, Marianne et BRUSTOLON, Maryanne, 1983. Development of an Attenuated Apathogenic Reovirus Vaccine against Viral Arthritis/Tenosynovitis. In : *Avian Diseases*. juillet 1983. Vol. 27, n° 3, p. 698. DOI 10.2307/1590312.
- VAN DER HEIDE, L. et PAGE, R. K., 1980. Field Experiments with Viral Arthritis/Tenosynovitis Vaccination of Breeder Chickens. In : *Avian Diseases*. avril 1980. Vol. 24, n° 2, p. 493. DOI 10.2307/1589718.
- VAN DER HEIDE, Louis, 2000. The History of Avian Reovirus. In : *Avian Diseases*. juillet 2000. Vol. 44, n° 3, p. 638. DOI 10.2307/1593104.
- VAN LOON, A.A.W.M., KOOPMAN, H.C., KOSMAN, W., MUMCZUR, J., SZELESZCZUK, O., KARPINSKA, E., KOSOWSKA, G. et LÜTTICKEN, D., 2001. Virology: Isolation of a new serotype of avian reovirus associated with malabsorption syndrome in chickens. In : *Veterinary Quarterly*. juillet 2001. Vol. 23, n° 3, p. 129-133. DOI 10.1080/01652176.2001.9695099.
- VAN LOON, Adriaan A. W. M., KOSMAN, Willeke, VAN ZUILEKOM, Hanneke I., VAN RIET, Suzanne, FRENKEN, Marijke et SCHIJNS, Virgil E. J. C., 2003. The contribution of humoral immunity to the control of avian reoviral infection in chickens after vaccination with live reovirus vaccine (strain 2177) at an early age. In : *Avian Pathology*. février 2003. Vol. 32, n° 1, p. 15-23. DOI 10.1080/0307945021000070679.
- WALKER, E R, 1972. Electron Microscopic Study of an Avian Reovirus That Causes Arthritis. In : . 1972. p. 13.
- WAN, Junjie, WANG, Cunwei, WEN, Xintian, HUANG, Xiaobo, LING, ShanShan, HUANG, Yong et CAO, Sanjie, 2011. Immunogenicity of a DNA vaccine of Avian Reovirus orally delivered by attenuated *Salmonella typhimurium*. In : *Research in Veterinary Science*. décembre 2011. Vol. 91, n° 3, p. 382-383. DOI 10.1016/j.rvsc.2010.09.007.
- WIT, Sjaak De, SCHRIER, Carla, DAM, Gerdy Ten, BIERMANN, Yvonne, VERSTEGEN, Ineke et EDENS, Frans, 2012. Detection and characterisation of a new astrovirus in chicken and turkeys with enteric and locomotion disorders. In : . 2012. p. 29.
- XIE, Zhixun, FADL, Amin A., GIRSHICK, Theodore et KHAN, Mazhar I., 1997. Amplification of Avian Reovirus RNA Using the Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction. In : *Avian Diseases*. juillet 1997. Vol. 41, n° 3, p. 654. DOI 10.2307/1592157.
- XIE, Zhixun, QIN, Chunxiang, XIE, Liji, LIU, Jiabo, PANG, Yaoshan, DENG, Xianwen, XIE, Zhiqin et KHAN, Mazhar I., 2010. Recombinant protein-based ELISA for detection and differentiation of antibodies against avian reovirus in vaccinated and non-vaccinated chickens. In : *Journal of Virological Methods*. avril 2010. Vol. 165, n° 1, p. 108-111. DOI 10.1016/j.jviromet.2009.12.008.
- XU, Wanhong et COOMBS, Kevin M, 2008. Avian reovirus L2 genome segment sequences and predicted structure/function of the encoded RNA-dependent RNA polymerase protein. In : *Virology Journal*. 2008. Vol. 5, n° 1, p. 153. DOI 10.1186/1743-422X-5-153.

ZAVALA, Guillermo, 2010. The Role of Vaccines in the Control of Avian Reovirus Infection. In : *Avian Insight*. 2010. Vol. Volume 4, p. 4.

ZHANG, Xing, TANG, Jinghua, WALKER, Stephen B., O'HARA, David, NIBERT, Max L., DUNCAN, Roy et BAKER, Timothy S., 2005. Structure of avian orthoreovirus virion by electron cryomicroscopy and image reconstruction. In : *Virology*. décembre 2005. Vol. 343, n° 1, p. 25-35. DOI 10.1016/j.virol.2005.08.002.

ZHANG, Yun, LIU, Ming, HU, Qilin, OUYANG, Shuidong et TONG, Guangzhi, 2006. Characterization of the σ C-encoding Gene from Muscovy Duck Reovirus. In : *Virus Genes*. avril 2006. Vol. 32, n° 2, p. 165-170. DOI 10.1007/s11262-005-6872-6.

ZHONG, Li, GAO, Li, LIU, Yongzhen, LI, Kai, WANG, Miao, QI, Xiaole, GAO, Yulong et WANG, Xiaomei, 2016. Genetic and pathogenic characterisation of 11 avian reovirus isolates from northern China suggests continued evolution of virulence. In : *Scientific Reports* [en ligne]. décembre 2016. Vol. 6, n° 1. DOI 10.1038/srep35271.

AGREMENT SCIENTIFIQUE

En vue de l'obtention du permis d'imprimer de la thèse de doctorat vétérinaire

Je soussigné, **Jean-Luc GUERIN**, Enseignant-chercheur, de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, directeur de thèse, certifie avoir examiné la thèse de **Jean-Pierre BREYSSE** intitulée «**Etude épidémiologique et virologique des ténosynovites à réovirus variants dans la filière poulet Label, France, 2016** » et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.

Fait à Toulouse, le 18 septembre 2018
Professeur **Jean-Luc GUERIN**
Enseignant chercheur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse



Vu :
La Directrice de l'Ecole Nationale
Vétérinaire de Toulouse
Isabelle CHMITELIN



Vu :
Le Président du jury :
Professeur **Jacques IZOPET**



M. Jean-Pierre BREYSSE
a été admis(e) sur concours en : 2013
a obtenu son diplôme d'études fondamentales vétérinaires le : 04/07/2017
a validé son année d'approfondissement le : 18/07/2018
n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.

Vu et autorisation de l'impression :
Président de l'Université
Paul Sabatier

Monsieur Jean-Pierre VINEL
Le Président de l'Université Paul Sabatier
par délégation,
La Vice-Présidente de la CFVU



Régine ANDRE-OBRECHT

TOULOUSE, 2018

NOM : BREYSSE

PRENOM : Jean-Pierre

TITRE : ÉTUDE EPIDEMIOLOGIQUE ET VIROLOGIQUE DES TENOSYNOVITES A REOVIRUS VARIANTS DANS LA FILIERE POULET LABEL, FRANCE, 2016

RESUME :

Les orthoréovirus aviaires sont responsables d'arthrites virales, affections locomotrices particulièrement rencontrées chez le poulet de chair.

Du fait de sa forte morbidité et de la sévérité des signes cliniques qui la caractérisent (boiteries, retards de croissance), cette maladie entraîne des pertes économiques considérables dans la filière avicole.

Ce manuscrit a pour objectif de dresser, dans un premier temps, une synthèse bibliographique des caractéristiques des réovirus aviaires, de l'arthrite virale et des autres affections dont ils sont responsables. On verra notamment que la lutte contre ces virus passe essentiellement par la vaccination des reproducteurs.

L'intérêt sera ensuite porté sur l'apparition récente de nouveaux réovirus variants à travers différents exemples d'émergence à l'échelle mondiale.

Enfin, une partie expérimentale permettra d'illustrer une de ces émergences, par l'étude virologique et épidémiologique de foyers de réovirose chez des poulets Label en France.

MOTS-CLES :

REOVIRUS AVIAIRE, ARTHRITE VIRALE, POULET, LABEL ROUGE, EMERGENCE, VIROLOGIE

TITLE: EPIDEMIOLOGIC AND VIROLOGIC STUDY OF VARIANT REOVIRUS TENOSYNOVITIS IN LABEL CHICKEN, FRANCE, 2016

ABSTRACT:

Avian orthoreovirus cause viral arthritis, locomotor disorders that are mainly concerning broilers.

Due to the high morbidity and the severe clinical signs that are linked to viral arthritis (lameness, stunting), this disease leads to substantial economic losses in poultry industry.

The aim of this study is to establish a bibliographic review of the avian reovirus properties and to describe the viral arthritis and the other disease conditions linked to those viruses. We will see, among other things, that the vaccination of breeders is the main strategy to protect the flocks.

Then, a focus on new variant reovirus emergence will be done by showing examples of clinical cases on a global scale.

Finally, an experimental part consisting in an epidemiologic and virologic study of Label Rouge chicken reovirus tenosynovitis cases in France will allow us to illustrate a concrete example of the variant emergence phenomenon.

KEY-WORDS :

AVIAN REOVIRUS, VIRAL ARTHRITIS, LABEL ROUGE, CHICKEN, EMERGENCE, VIROLOGY