

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
--------------------	---

1^{ère} partie : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I. LE CONTEXTE DE LA PRODUCTION D'OIES A GAVER	3
I.1. Contexte économique.....	3
I.2. Organisation de la filière et itinéraires techniques	3
I.3. Le contexte sanitaire de la production d'oie à gaver : dominantes pathologiques et prophylaxie	7
I.3.1. Maladies au cours du démarrage.....	7
I.3.2. Maladie en cours de croissance: (3 semaines -12 semaines):.....	8
II. LA NHEO : DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES	12
II.1. Historique et répartition de la maladie.....	12
II.2. Epidémiologie	12
II.2.1. Épidémiologie descriptive	12
II.2.2. Epidémiologie analytique.....	13
II.3. Symptômes et lésions.....	13
II.3.1. Symptomatologie	13
II.3.2. Tableau lésionnel	14
III. HYPOTHESES ETIOLOGIQUES.....	16
III.1. Hypothèses non virales	16
III.2. Hypothèse virale.....	17

2^{ème} partie :
ETUDE EXPERIMENTALE

I. MATERIELS ET METHODES	20
I.1. Reproduction expérimentale de la NHEO	20
I.2. Concentration et purification du virus à partir d'organes prélevés	21
I.3. Adaptation du virus à la culture cellulaire et immunofluorescence	23
I.3.1. Culture du virus.....	23
I.3.2. Détection des antigènes viraux par immunofluorescence	23
I.3.3. Protocole de purification virale à partir de lysats de cultures cellulaires	24
I.4. Microscopie électronique.....	26
I.4.1. Visualisation du virus à partir d'organes purifiés	26
I.4.2. Visualisation du virus dans les cellules infectées	26
I.5. Analyse moléculaire : extraction, amplification et séquençage de l'acide nucléique viral	26
I.6. Alignements et analyse phylogénétique de la séquence de la VP1	28
II. RESULTATS	29
II.1. Reproduction expérimentale de la maladie	29
II.2. Purification et isolement du virus	30
II.3. Observations en microscopie électronique des particules purifiées	30
II.4. Adaptation du virus à la culture cellulaire.....	31
II.5. Analyse moléculaire	33
III. DISCUSSION	36
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	39
TABLE DES ILLUSTRATIONS	41
REFERENCES	42

INTRODUCTION

La NHEO (Néphrite Hémorragique Entérite de l'Oison) ou encore appelée « maladie tardive » ou « maladie des jeunes oies en croissance » a été décrite pour la première fois en France en 1977. Cette maladie affecte les oies en élevage et depuis peu en gavage. Elle est très ancienne puisque la première description de cette entité pathologique remonte à 1970, en Hongrie.

De nature sporadique, elle se révèle particulièrement meurtrière pendant la période 1988 à 1991. Sa ré-émergence au cours de l'hiver 1996-1997 inquiète les éleveurs, déroutés face à une maladie dont l'étiologie demeure inconnue et dont on ne maîtrise ni l'apparition, ni le développement dans les élevages affectés.

Actuellement on peut affirmer qu'elle touche environ 20% de la production. Outre les pertes directes liées à la mortalité (10 à 80% des bandes d'animaux), la NHEO constitue actuellement un frein au développement de la production, dans un contexte de demande croissante de produits d'origine française. C'est pourquoi les acteurs de la filière : le CIFOG (Comité Interprofessionnel des palmipèdes à Foie Gras), l'OFIVAL (Office Interprofessionnel des Viandes, de l'Elevage et de l'Aviculture), vétérinaires industriels et éleveurs ainsi que les Conseils Régionaux de Midi-Pyrénées et d'Aquitaine se sont mobilisés dans le but d'éradiquer la NHEO et de prévenir sa réapparition.

En 1976, les travaux de Schettler évoquent l'hypothèse virale mais sans la démontrer. Plus tard, en 1992, Sans observe de manière imprécise des particules virales en microscopie électronique.

En mettant en œuvre de nouvelles approches moléculaires, nous avons pu isoler l'agent étiologique de la NHEO et caractériser ce nouveau polyomavirus aviaire spécifique de l'oie. S'enchaînent alors avec l'identification formelle du virus, la recherche et la mise en place d'outils de diagnostic et de prévention.

Dans une première partie nous proposerons une synthèse des données bibliographiques relatives à la maladie : épidémiologie, symptomatologie, lésions caractéristiques. nous dresserons le bilan des divers investigations réalisées sur la NHEO au cours des 30 dernières années.

La deuxième partie sera consacrée à la recherche expérimentale de l'agent étiologique de la NHEO. Nous démontrons l'origine virale de la maladie et identifions le virus responsable.

1^{ère} partie :

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I. LE CONTEXTE DE LA PRODUCTION D'OIES A GAVER

I.1. Contexte économique

La filière « oies à gaver » représente actuellement une production « niche » parmi les palmipèdes à foie gras. En 2000, le cheptel français avoisinait les 900 000 têtes (*versus* environ 38 millions de canards mulards). Cet effectif est en augmentation significative depuis deux ans (+24% de mise en place d'oisons d'un jour en 1999, +20% en 2000), malgré la reprise des importations de foie gras d'oie (augmentation de 17,5 % avec 954 tonnes, la Hongrie étant le principal fournisseur). Cette évolution résulte pour l'essentiel de la pression des opérateurs, désireux de s'approvisionner en produits d'origine française tracée et d'un plan de relance initié par le CIFOG, portant notamment sur la sélection, la reproduction et les itinéraires techniques. Cette croissance relative de la production est contrariée depuis 3 ans par la ré-émergence d'une affection, la NHEO (Néphrite Hémostatique Entérique de l'Oison), à l'origine d'épisodes de mortalité redoutables (Guérin *et al.*, 1998). Actuellement on peut considérer cette maladie comme LA contrainte sanitaire majeure qui amène des producteurs à se détourner de l'oie au profit du canard mulard.

I.2. Organisation de la filière et itinéraires techniques

Deux systèmes de production peuvent être distingués (Figure 1) :

- **La filière courte ou traditionnelle**, fondée sur la commercialisation directe des produits sur l'exploitation ou sur des marchés physiques. L'éleveur cumule toutes les tâches : il s'auto-approvisionne en oisons, les élève jusqu'à la fin du gavage ; l'abattage se réalise aussi à la ferme sous autorisation.
- **Le système « Prêt-à-gaver »**, où chaque éleveur occupe une fonction à un stade précis de la production : l'accoureur fournit les oisons à l'éleveur qui amène les animaux jusqu'à l'entrée en gavage. Le gaveur les engraisse. Dans ce schéma, l'éleveur fournit donc des animaux prêt A Gaver (PAG).

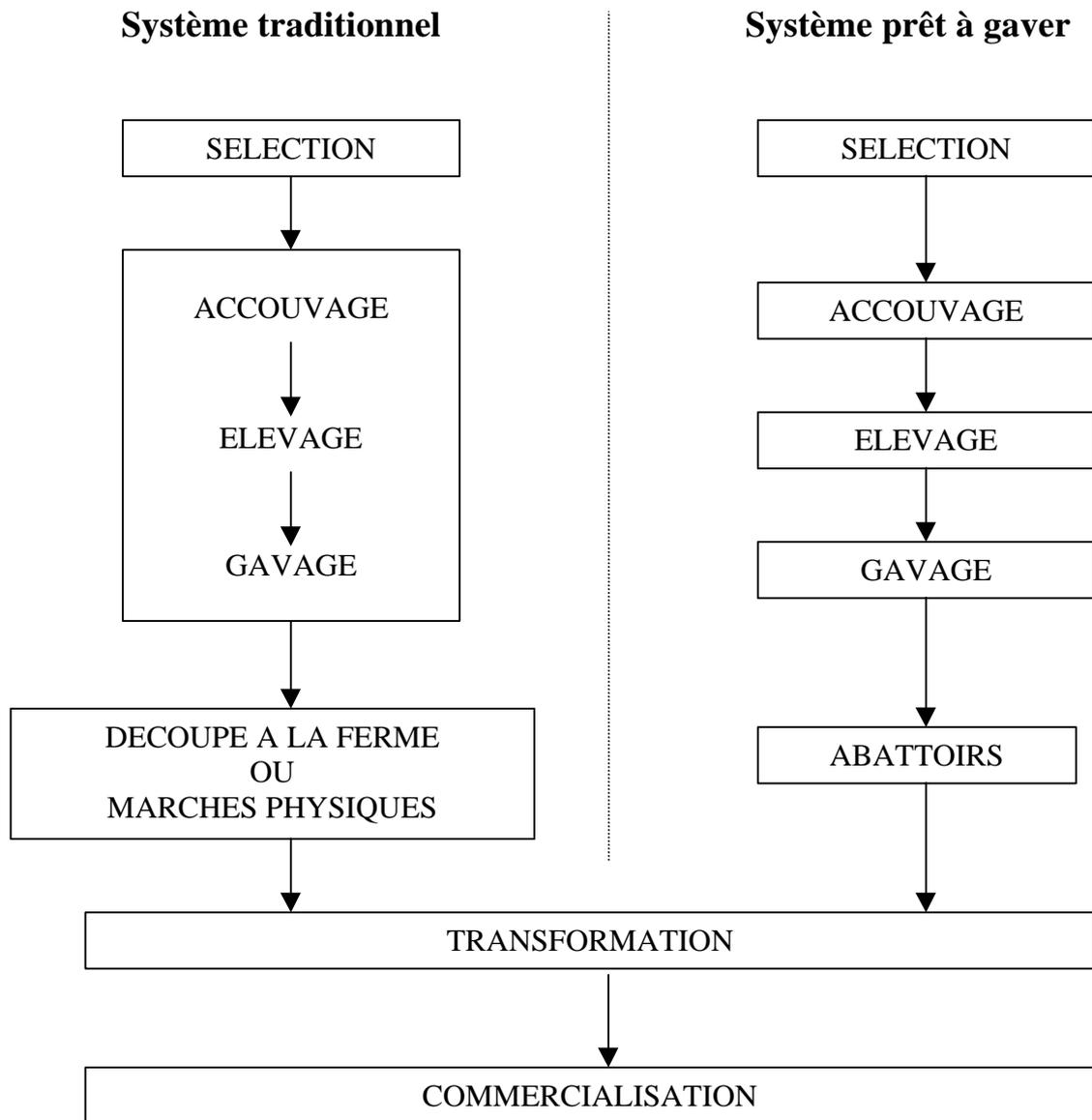


Figure 1 : comparaison du système prêt à gaver (PAG) et du système traditionnel

Le système traditionnel encore représenté dans le Sud-Ouest tend à disparaître au profit du système prêt à gaver. En effet la possibilité d’investissements plus importants concernant un atelier spécialisé permet d’augmenter la taille des bandes (Bande unique de 1200 oies), ce qui à pour effet d’accroître la rentabilité et la maîtrise des risques sanitaires.

En ce qui concerne la production d’oies « prêtes à gaver », c’est toute une filière qu’il faut mettre en place : élevages de reproducteurs, couvoirs, élevages dits de « prêt à gaver » et enfin gaveurs spécialisés. Pour chaque maillon de la filière, nous pouvons observer des contraintes distinctives par rapport à la production du canard mulard :

- Sélection

Comparée au canard mulard, qui bénéficie de la sélection du mâle Barbarie pour la chair et de la cane Pékin, l'oie à gaver fait l'objet d'une sélection extrêmement limitée, entreprise à la station INRA (Institut National de la Recherche Agronomique) d'ARTIGUERES, puis reprise par la SEPALM à SOUPROSSE. En particulier, l'absence de sélection sur le développement des masses musculaires est à l'origine de la mauvaise qualité des carcasses d'oie. Le ratio 500000 canes reproductrices / 6000 oies en 1998 permet d'imaginer l'énorme distorsion des efforts de sélection entre ces deux espèces.

- Multiplication

Les ateliers de reproducteurs comptent quelques centaines à quelques milliers de reproductrices (à raison d'un mâle pour 3-4 femelles).

Une première difficulté est liée à l'irrégularité d'approvisionnement en oisons sur le marché, en raison du caractère saisonnier de la ponte (au printemps). Le désaisonnement de la ponte, grâce à l'élevage en semi-claustration et l'application d'un programme lumineux (9 à 14 h d'éclairage journalier), occasionne un coût supplémentaire dans la production de l'oison par rapport au caneton (2 fois plus cher).

De plus, la mise au point de l'insémination artificielle du canard a permis d'augmenter le pourcentage d'œufs fécondés, réduisant considérablement le coût du caneton (12F en 2000). L'oie est une mauvaise pondeuse (35 œufs environ, soit 30 oisons par ponte), très sensible aux variations de l'intensité et de la durée de l'éclairage. La ponte est maximale à 2 ans puis décroît très rapidement. A l'opposé la cane pékin pond 210 à 230 œufs sur une période de 40 à 45 semaines.

- Elevage

Il dure de 12 semaines en système « Prêt-à-gaver » à 16 semaines dans le schéma « traditionnel ». Pour l'essentiel, l'itinéraire technique est comparable à celui du canard.

L'oie est un animal fragile en cours d'élevage, ceci est surtout vrai pendant la phase de démarrage (fragilité en milieu de croissance, autour de 6 semaines). Les contraintes d'ambiance au démarrage sont donc plus strictes que pour le canard. Un parcours extérieur sur herbe est indispensable vers la 6^{ème} semaine d'élevage.

- Gavage

Le gavage de l'oie est manifestement beaucoup plus contraignant et plus délicat que pour le canard. Ainsi une oie doit être gavée pendant 16 ou 17 jours à raison de 3 repas, ou 2 repas avec « repasses » par jour, contre 12 jours et 2 rations quotidiennes pour le canard. De même, les oies ne peuvent pas être contenues en cages individuelles, comme c'est largement le cas pour les ateliers de gavage de mulards. Ainsi, si un gaveur prend en charge jusqu'à 1000 canards, pour une salle de gavage d'oie le maximum se situe aujourd'hui à 500 têtes (notons qu'à terme, l'interdiction probable de la contention en cages individuelles pour le gavage des palmipèdes fera disparaître cette disparité).

En conclusion le foie gras d'oie ne représente que 6 à 8 % du marché total du foie gras. L'oie représente donc une espèce mineure dont l'avenir devient de plus en plus inquiétant avec l'émergence de la NHEO. L'importance économique de la NHEO est liée au fait que les oies meurent à l'âge où elles seront prêtes à gaver c'est à dire où le coût de production est déjà élevé.

I.3. Le contexte sanitaire de la production d'oie à gaver : dominantes pathologiques et prophylaxie

I.3.1. Maladies au cours du démarrage

- Maladies liées à un défaut de maîtrise d'ambiance :

Il s'agit de « technopathies » se soldant souvent par des néphrites. En effet, l'oie au démarrage est un « sous-équipé physiologique »; il existe de grandes variations de ses régulations hormonales ; un dysfonctionnement des corticosurrénales vient perturber le métabolisme de l'eau (effet minéralocorticöide), à cela s'ajoute un retard de mise en place des fonctions d'excrétion dû à la persistance de la structure embryonnaire du rein chez l'oison.

- Salmonelloses :

La salmonellose se déclare chez le jeune avant 3 semaines, provoquant parfois des mortalités en coquille. Maladie non spécifique au démarrage car on la rencontre durant toute la croissance et surtout en phase de gavage. Les germes fréquemment impliqués sont *Salmonella typhimurium* et *S. enteridis*. L'infection se manifeste par un abattement de l'animal qui, parfois, présente de la diarrhée, des articulations gonflées et /ou un ombilic mal cicatrisé. Le traitement consiste en l'administration d'antibiotiques actifs contre les Gram- . Il est à noter que l'importance de cette maladie est essentiellement zoonotique.

- colibacilloses :

Elle affecte les jeunes de 0 à 8 semaines avec de la mortalité en coquille, des signes de septicémie accompagnés ou non d'omphalite, des sécrétions oculaires, des problèmes respiratoires. Chez l'adulte on rencontre souvent la forme respiratoire mais des lésions d'ovarite chez la femelle, de péritonite, de péricardite sont des signes de suspicion. Le développement de cette maladie est fulgurant et toute mortalité importante sans signes cliniques évoquera cette pathologie. Le traitement spécifique sera basé sur une antibiothérapie à spectre large et on insistera sur le respect strict de l'hygiène (nettoyage-désinfection-vidé sanitaire).

- Aspergillose :

On constate actuellement sa recrudescence dans le Sud-Ouest; son apparition est liée soit à une contamination au couvoir, soit à une contamination des oisons par la paille mal récoltée ou mal stockée (humidité et échauffement favorisent le développement des moisissures, en l'occurrence *Aspergillus fumigatus*). L'aspergillose se manifeste par des broncho-pneumonies rapidement mortelles chez l'oison; des mortalités en coquille signifient une contamination au couvoir à cause d'erreur(s) de manipulation lors de la récolte des œufs. Une respiration ronflante et une diarrhée blanchâtre secondaire complétée par des lésions de fausses membranes sur les muqueuses évoqueront la maladie. Chez l'adulte l'affection chronique produira des oisons à non valeur économique ou se compliquera d'autres infections respiratoires tel que colibacilloses, mycoplasmoses...

I.3.2. Maladie en cours de croissance: (3 semaines -12 semaines):

- Maladies systémiques:

- Derszy (Jeune animal en croissance) :

Elle est associée à un parvovirus dont auquel l'oison est surtout sensible dans les 3 premières semaines de la vie. C'est un germe très contagieux et très résistant dans le milieu extérieur, responsable d'une forte mortalité. Les symptômes et les lésions observés dans la forme aiguë de la maladie ne sont pas sans rappeler la NHEO : les animaux sont apathiques, présentent des difficultés locomotrices, de la diarrhée, la mort survient rapidement ; à l'autopsie on constate régulièrement : hépato-néphrite, splénomégalie, goutte viscérale.

La vaccination systématique des reproducteurs (2 injections à 3 semaines d'intervalle avant l'entrée en ponte) a pratiquement permis d'éradiquer cette pathologie ; quant aux oisons, ils reçoivent leur première injection entre 18 et 21 jours, lorsque les anticorps maternels ont quasiment disparu.

- Choléra (*Pasteurella multocida*), à 6-10 semaines et en gavage :

Très contagieux, il est responsable d'une mortalité importante entraînant de lourdes conséquences économiques. Il touche principalement les adultes et se déclare souvent après un épisode de stress (vaccination, période de reproduction, gavage, défaut d'ambiance, passage d'un prédateur). Cette maladie est omniprésente dans les élevages du fait de sa persistance dans

le milieu extérieur et de l'existence de nombreux porteurs sains (oiseaux, rongeurs, animaux domestiques); l'homme peut être contaminé.

L'utilisation répétée d'antibiotiques à spectre Gram- durant au moins 5 jours avec une vitaminothérapie (vit C et A) permet de limiter la casse mais ne blanchit pas les bandes concernées. Les conséquences économiques de cette maladie impose une vaccination systématique : le Landavac™ ou l'Avipastovac™ à 6 semaines avec un rappel à 10 semaines sont deux vaccins inactivés et adjuvés, régulièrement utilisés dans les élevages infectés. En cas d'échec les auto-vaccins sont utilisés.

- Riemerellose :

due à *Riemerella anatipestifer* dont l'identification est souvent difficile car son isolement en culture est très délicat. De nature sporadique, elle était considérée comme une pathologie mineure, jusqu'à la récente augmentation de l'incidence des cas. Les animaux atteints ont entre 1 à 8 semaines d'âge avec un pic aux environs de 4-6 semaines. La riemerellose entraîne des signes de « ramping », des tremblements de la tête puis de la mortalité (5-10 %); on observe aussi des diarrhées liquides, blanchâtres, des écoulements nasaux et oculaires avec des retards de croissance. A l'autopsie, on note très régulièrement une polysérosite fibrineuse et la présence d'une néphrite est constante.

Le traitement répond bien aux antibiotiques classiques tels que les sulfamides et surtout l'amoxicilline, mais un antibiogramme est conseillé pour traiter efficacement le germe isolé. La prophylaxie est avant tout sanitaire, comme pour le choléra; seuls des autovaccins sont utilisés en prophylaxie médicale et sont souvent couplés avec la valence *Pasteurella multocida*.

- Herpesvirose :

Cette infection est rencontrée de façon très épisodique chez le canard de Barbarie, elle existe chez l'oie sous une forme asymptomatique. L'oie tient donc une place en tant que vecteur de la maladie.

- Maladies digestives :

- Entérotoxémie :

On rencontre cette pathologie lors d'un déséquilibre alimentaire notamment lors d'une mauvaise préparation au gavage ou un mauvais rationnement autour de la période des 6

semaines où l'apport d'herbe en quantité suffisante est indispensable pour freiner un appétit intempestif. L'excès d'amidon entraîne un déséquilibre de la flore intestinale par diminution du pH ; la prolifération de germes anaérobies dans le tube digestif libère des toxines dans le sang. Les signes évocateurs sont une diarrhée verdâtre, profuse, nauséabonde avec soif importante; régulièrement la mort est précédée de phénomènes nerveux avec prostration.

Le traitement est réalisé par l'administration *per os* d'antibiotiques à large spectre et du bicarbonate de soude associé ou non à des hépatoprotecteurs. Il est parfois utile d'ajouter des ferments lactiques lors d'excès de protéines dans la ration.

- Coccidioses intestinales :

Les ookystes sont présents de façon permanente dans toutes les exploitations, que ce soit chez l'animal ou dans l'environnement (litière, instruments d'élevage divers); c'est donc une pathologie de routine touchant les animaux soumis aux stress (rôle favorisant du gavage). Les espèces fréquemment rencontrées sont *Eimeria anseris* et *E. necans*.

On constate un affaiblissement des oiseaux avec des signes de diarrhée parfois hémorragique. Les traitements sont réalisés à l'aide d'une sulfamidothérapie dans l'eau de boisson ou, pour plus d'efficacité, le Toltrazuril. La prévention consiste comme pour les autres espèces à éviter le mélange d'animaux d'âges différents, à favoriser les rotations de parcours, à respecter les vides sanitaires après une désinfection rigoureuse des bâtiments, des conduites d'eau et des chaînes d'alimentation.

Notons que la forme rénale à *E. truncata* est nettement plus rare.

- Maladies respiratoires :

Le plus souvent ce sont des syndromes multifactoriels dans lesquels interviennent d'abord des facteurs d'ambiance (le confinement associé à une mauvaise ventilation produit de l'ammoniac, charge l'air en poussière, ce qui favorise l'irritation de la muqueuse); on constate une diminution des défenses locales de l'appareil respiratoire, on assiste alors à une multiplication opportuniste de germes dont le mycoplasme. Les colibacilles sont les agents de surinfection les plus courants mais on peut isoler aussi des pasteurelles, protéus, streptocoques, staphylocoques, bordetella, haemophilus...

Souvent on constate une atteinte de tout le troupeau avec apparition de signes respiratoires aigus ou chroniques.

Malgré des traitements antibiotiques classiques de la sphère respiratoire (tétracyclines, sulfamides, amoxicilline, quinolones), les retards de croissance avec des problèmes respiratoires chroniques sont fréquents.

En conclusion si certains symptômes sont pathognomoniques d'une maladie, il est souvent nécessaire de réaliser un examen nécropsique détaillé. Après avoir prélevé les organes atteints, des recherches histologique, bactériologique, sérologique, virologique... permettront de déterminer l'agent causal avec plus de certitude.

On constate que la plupart des cas pathologiques rencontrés survient à la suite d'un problème d'ambiance, de conduite d'élevage ou de pression microbienne. L'éleveur est donc tenu de respecter les règles de prophylaxie sanitaire et médicale car, quelque soit le facteur déterminant, on s'aperçoit toujours de l'implication du non-respect des règles d'élevage et/ou des règles sanitaires.

II. LA NHEO : DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

II.1. Historique et répartition de la maladie

La première description de la NHEO remonte à 1970, en Hongrie (Bernath et Szalai, 1970). Elle a été rapportée pour la première fois dans le sud-ouest de la France en 1977 (Schettler, 1977). Depuis, la NHEO a touché les élevages de manière sporadique, avec des épisodes particulièrement meurtriers entre 1988 et 1991 (Sans, 1992). Les travaux de Pierre Sans et d'Aimé Vuillaume s'étaient alors arrêtés, faute de financement.

Depuis l'hiver 1996-1997, de nombreux épisodes furent constatés : la majorité des cas récents rapportés concerne le bassin de production « traditionnel » : Landes, Gers, Lot et Dordogne. Cependant, des cas isolés ont été décrits en Charente, Haute Vienne, Sarthe et Haut-Rhin (production d'oies blanches à rôtir).

Actuellement, sur le plan international, aucune donnée ne permet d'affirmer l'existence de foyers dans les autres bassins de production en Europe (Hongrie), ou en Asie du Sud-Est.

II.2. Epidémiologie

II.2.1. Épidémiologie descriptive

La NHEO apparaît au mois d'avril avec une majorité des cas déclarés entre mi-mai et mi-juin (Sans, 1992). On ne rencontre cette maladie que chez l'oie; aucun cas n'est recensé chez les autres palmipèdes. On admet que l'agent de la NHEO peut présenter une longue persistance chez les animaux infectés, des animaux apparemment sains pouvant être porteurs de la maladie. Sévissant tout d'abord sous forme sporadique, elle se répand ensuite de manière épizootique (Sans, 1992). La NHEO frappe classiquement les animaux entre 5 et 10 semaines, avec un taux de mortalité de 20 à 80 % sur les lots atteints. Au delà de la 12^{ème} semaine, les oies semblent réfractaires à la maladie. Les épisodes récents sont caractérisés par des manifestations cliniques tardives : il n'est pas rare d'observer des cas en gavage, ce qui était exceptionnel dans les cas apparus entre 1988 et 1991. Aucune thérapeutique n'est efficace.

Il n'y a pas de corrélation entre la taille des bandes ou l'état sanitaire des élevages avec les épisodes de NHEO, bien que les pourcentages de mortalités sont plus importants dans les élevages où la pression parasitaire est élevée.

Les résultats techniques en gavage des animaux rescapés de la NHEO sont comparables à ceux obtenus avec une bande saine (Sans, 1992).

II.2.2. Epidémiologie analytique

Le virus, étroitement spécifique de l'oie, semble être faiblement contagieux.

La période d'incubation constatée sur le terrain est longue (de 3 semaines à 2 mois d'après Sans); elle est beaucoup plus courte par inoculation expérimentale (1 à 10 jours).

Les voies de transmission de l'agent sont encore mal connues; la résistance du virus favorise vraisemblablement la contamination des animaux démarrés dans un bâtiment contaminé. Il apparaît qu'expérimentalement, la sensibilité des animaux à l'infection se limite aux 3 à 4 premières semaines de vie, ce qui met en exergue l'importance de la maîtrise sanitaire au démarrage. La possibilité d'une transmission verticale n'est pas à exclure mais ne peut être affirmée en l'état actuel des travaux.

II.3. Symptômes et lésions

II.3.1. Symptomatologie

Dans les conditions du terrain, la mort est le plus souvent précédée d'un état comateux des animaux, qui s'isolent, ne consomment et ne boivent plus. On observe régulièrement une diarrhée discrète.

Dans les formes suraiguës (rencontrées lors de l'inoculation expérimentale d'oisons d'un jour avec des broyats d'organes infectés), on note souvent des troubles nerveux (pédalage, opisthotonos) qui conduisent à 100 % de mortalité. Dans les formes plus tardives, des troubles locomoteurs sont fréquents, reliés à des dépôts d'urates dans les articulations. (Guérin *et al.*, 1999).

Les oies qui survivent sont supposées être infectées de manière persistante (Schettler, 1980). Les animaux morts présentent souvent une posture assez caractéristique (Figure 2).

II.3.2. Tableau lésionnel

- *Lésions macroscopiques*

Les lésions observées à l'autopsie sont caractéristiques (Schettler, 1980) : une ascite gélatineuse et un œdème gélatineux sous-cutané sont constamment observés (Figure 3).

Une néphrite, souvent hémorragique est également régulièrement relevée (présence parfois de dépôts d'urates dans les reins), avec pour les formes d'évolution tardive, des lésions de goutte viscérale associées. Ces dépôts d'urates s'observent aussi dans les articulations. On note également, de manière moins régulière, une entérite mucoïde, souvent hémorragique, voire nécrotique (Figure 4) (Kisary, 1993).

D'un animal à l'autre, une grande variabilité lésionnelle peut être observée, en fonction notamment de la rapidité de l'évolution vers la mort.

- *Lésions microscopiques*

A l'examen histologique, on observe régulièrement des lésions de nécrose de la muqueuse intestinale ainsi qu'une inflammation de l'interstitium rénal (Kisary, 1993). La bourse de Fabricius présente des lésions de lympholyse folliculaire, vraisemblablement associée à une déplétion des populations de lymphocytes B (Guérin *et al.*, 2000). Les lésions d'entérite sont également associées à une nécrose de l'épithélium intestinal. Des foyers hémorragiques sont observés dans de nombreux tissus, en particulier dans les formes suraiguës.

Nous n'avons jamais observé d'inclusions intranucléaires ou cytoplasmiques dans les différents tissus infectés.

Bien que cette maladie soit assez bien caractérisée sur le plan clinique et nécropsique, son étiologie est restée obscure jusqu'à ce jour, même si l'on admettait qu'elle était vraisemblablement virale (Schettler, 1980) sans en avoir la preuve formelle.



Figure 2 : position caractéristique de l'oison mort de NHEO

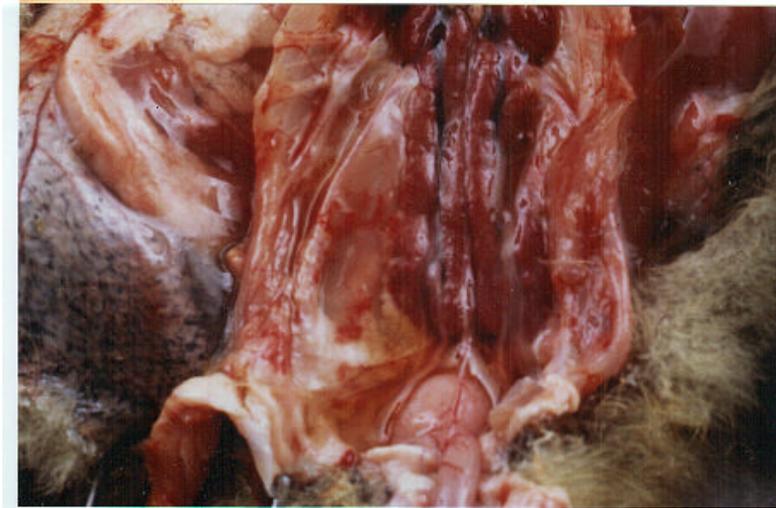


Figure 3 : ascite et œdème gélatineux



Figure 4 : entérite hémorragique avec foyers de nécrose

III. HYPOTHESES ETIOLOGIQUES

La NHEO a longtemps été considérée comme une forme tardive de la parvovirose de l'oie ou maladie de Derszy, d'où les dénominations « *maladie tardive* » ou « *maladie des jeunes oies* », que l'on retrouve dans les premières descriptions de cette maladie (Kisary, 1993).

Dans ce chapitre, nous parcourons les différentes hypothèses publiées par leurs auteurs.

III.1. Hypothèses non virales

C'est dans cette voie que VUILLAUME, TOURNUT ET BANON ont axé leurs travaux (Vuillaume *et al.*, 1982) : ils suggèrent que la précipitation de complexes antigène-anticorps, avec fixation du complément au niveau de fins réseaux capillaires rénaux, serait à l'origine de lésions rénales et d'une auto-intoxication de l'organisme par défaut d'élimination. Ils abandonnent cette hypothèse à la faveur d'erreurs d'élevage : en effet les auteurs constatent fréquemment que l'alimentation des troupeaux affectés par la NHEO est très souvent déséquilibrée (une ration excédentaire en glucides et pauvre en protéines, oligo-éléments, vitamines). Les myopathies engendrées seraient responsables des troubles locomoteurs et la genèse d'un déséquilibre de la flore bactérienne intestinale favoriserait l'apparition d'un état diarrhéique voire d'une infection intestinale avec toxémie (l'état diarrhéique entraînerait une hypovolémie et une hémococoncentration, l'ascite abdominale et les œdèmes sous-cutanés en seraient les conséquences cliniques).

Cette théorie de l'alimentation défectueuse n'exclue pas l'implication concomitante d'un agent pathogène émergeant sur un terrain favorable à son développement.

Des examens parasitologiques, bactériologiques et biochimiques mis en œuvre par SANS sont restés négatifs, appuyant encore l'hypothèse virale.

Le même auteur conclue par ses travaux que :

L'agent pathogène n'est pas de nature toxique : en effet, la maladie se reproduit par passages successifs sur oisons, sans observation d'une dilution de l'agent.

Les inocula traités avec des antibiotiques à large spectre reproduisent aussi la maladie. L'origine bactérienne de la NHEO est donc dès lors fort peu vraisemblable, même si, à ce stade, on ne peut pas l'exclure formellement.

Les recherches se sont donc orientées vers l'isolement et l'identification d'un virus.

III.2. Hypothèse virale

Tous les auteurs ont suspecté comme agent responsable de la NHEO un virus sérologiquement éloigné de tous les virus aviaires connus (Bernath et Szalai, 1970 ; Szalai, F., and S. Bernath, 1971 ; Kisary, 1993 ; Schettler, 1980 ; Sans, 1992).

En 1970, BERNATH et SZALAI pensent à un virus différent du parvovirus β responsable de la maladie de Derszy. Leurs travaux se sont limités à la démonstration de la responsabilité d'un agent transmissible et infectieux en reproduisant la maladie par inoculation à des oisons d'un jour d'un broyat d'organes filtrés.

SCHETTLER, quelques années plus tard, s'intéresse à un virus spécifique différent du parvovirus résistant au phénol et persistant dans le milieu extérieur.

COUDERT suppose contrairement aux travaux de Bernath et Szalai et à ceux de Schettler que l'agent pathogène est le même que celui de la maladie de Derszy. Cette hypothèse se heurte au fait que les oisons présentant des titres élevés d'anticorps neutralisants contre le parvovirus sont pleinement sensibles à l'infection par le virus NHEO. De plus la vaccination contre la maladie de Derszy n'enraye pas la NHEO.

C'est en 1992 que VUILLAUME et SANS confirment l'étiologie virale en inoculant à des oisons de 2 jours une fraction purifiée à partir d'organes infectés : cette inoculation reproduit en tout point la maladie. L'observation en microscopie électronique de structures denses d'un diamètre de 40 à 60 nm difficilement identifiables évoque des formes virales de type « toga-like ». Ces particules sont totalement absentes sur les préparations à partir d'oison témoin.

A défaut de pouvoir isoler formellement et identifier le virus, les travaux de Pierre Sans permettent d'exclure successivement une identité avec les virus décrits chez les palmipèdes (parvovirus de la maladie de Derszy, herpesvirus de la peste du canard, hépatite du caneton...), en montrant l'absence de croisements sérologiques entre l'agent de la NHEO et ces virus (Sans, 1992).

Si le rôle central d'un virus dans l'apparition d'un épisode clinique de NHEO est désormais établi, des facteurs favorisants (suralimentation en début d'élevage, mauvaises conditions de logement) sont certainement responsables de la sévérité des épisodes cliniques (Sans, 1992), et doivent faire l'objet d'une attention toute particulière : les stress liés à des interventions (vaccination,...) peuvent également être des facteurs déclenchants d'un épisode de NHEO.

2^{ème} partie :

ETUDE EXPERIMENTALE

Depuis les premières descriptions des cas de NHEO, les recherches se sont progressivement orientées vers une origine virale mais jusqu'ici l'identification formelle de cet hypothétique virus n'a pas encore abouti. Parallèlement on constate un échec des différentes investigations concernant la lutte contre cette maladie. En effet la caractérisation précise du germe responsable, la compréhension de sa pathogénicité (mode de transmission, réplication dans l'organisme, excrétion) et ses caractéristiques en culture sont des étapes indispensables avant de mettre en œuvre des mesures prophylactiques adaptées.

Nous présentons, dans cette partie, les travaux expérimentaux concernant l'isolement et la caractérisation de l'agent viral responsable de la NHEO (Guérin *et al.*, 2000). Après reproduction expérimentale de la maladie, les particules virales sont extraites d'organes infectés et visualisées en microscopie électronique. L'inoculation de cette solution virale purifiée permet de reproduire la maladie, ce qui démontre leur rôle étiologique. La mise au point de la culture du virus sur système cellulaire permet ensuite d'obtenir de grandes quantités de virus en s'affranchissant des productions *in vivo*, très contraignantes. C'est à partir de cette étape que la visualisation du virus dans les cellules infectées par microscopie électronique ou par immunofluorescence indirecte est rendue possible. Le recours à la biologie moléculaire s'impose alors pour aboutir à une identification formelle. Dans cette démarche, nous avons utilisé des amorces moléculaires aléatoires; un fragment de 1175 paires de bases a été produit par amplification génomique, puis séquencé et comparé à d'autres virus connus. Une partie de ce fragment de gène composée de 144 paires de base sera utilisée dans le dépistage de la NHEO au travers des prélèvements récoltés dans les élevages infectés ou réalisés sur les oisons infectés ou non expérimentalement.

I. MATERIELS ET METHODES

I.1. Reproduction expérimentale de la NHEO

Deux types de travaux de reproduction expérimentale sont effectués :

Protocole ① : 12 oisons conventionnels âgés de un jour sont inoculés par voie sous-cutanée avec des broyats de foie et de rate prélevés en élevage, sur des animaux ayant présentés les signes cliniques et nécropsiques de NHEO.

L'inoculum est constitué de 500 µl d'une dilution au 1/5^{ème} de broyat d'organes dans du tampon TNE : tampon A, filtré à 0,22µm et additionné de Pénicilline (10 000 UI/ml) et de Streptomycine (10 µg/ml). 6 oisons non inoculés constituent des témoins négatifs.

$$\text{Composition du tampon A : } \left\{ \begin{array}{l} \text{Tris } 10 \text{ mM} \\ \text{NaCl } 100 \text{ mM} \quad (\text{pH} = 7,2) \\ \text{EDTA } 1 \text{ mM} \end{array} \right.$$

Protocole ② : Le foie et la rate prélevés sur les animaux morts à la suite de la première inoculation (protocole ①) sont soumis à un protocole de purification du virus (Trudel et Payment, 1980, Guérin *et al.*, 1998). Des fractions de chaque produit intermédiaire du protocole de purification sont conservées à -80°C et inoculées à des oisons de un jour (6 oisons par fraction inoculée). De même, on teste le caractère infectieux de fractions purifiées après un traitement thermique à 55°C pendant une heure et d'extraits de cultures cellulaires infectées ou non. Dans tous les cas, La mort des oisons inoculés avec ses différentes suspensions démontre la présence du virus.

Lors de la reproduction de la maladie, les animaux sont hébergés dans des cages métalliques et entretenus en conformité avec les normes *ECCAC (European Community Council on Animal Care)*. Ils sont chauffés à l'aide de radiants infrarouges électriques et disposent d'eau et d'aliment composé *ad libitum*.

Les animaux inoculés et contrôles sont examinés quotidiennement. Les oisons morts ou sacrifiés font l'objet d'un examen nécropsique complet : les lésions observées sont systématiquement notées et enregistrées. Le lot d'oies témoin négatif est euthanasié 10j après la mort du dernier sujet du lot inoculé.

Le foie, la rate et les reins sont prélevés sur toutes les oies et sont immédiatement congelés à -80°C. Des échantillons de différents organes (foie, rein, rate, intestin, cerveau, bourse de Fabricius) sont fixés dans une solution de formol à 10 % en vue d'un examen histologique.

I.2. Concentration et purification du virus à partir d'organes prélevés (Figure 5)

Les foie et rate prélevés sur les animaux morts expérimentalement de NHEO (protocole ①) sont broyés dans du tampon (TNE pH 7,2) dans un rapport de 1/5 poids/volume. Après centrifugation (3000 g pendant 15 min), le surnageant est prélevé et traité deux fois au trichlorotrifluoroéthane (Fréon, Sigma) afin d'en extraire les lipides. La phase aqueuse est récupérée délicatement sans perturber l'interphase et clarifiée à l'aide d'une centrifugation (10 000 g pendant 20 min). Le surnageant est ensuite concentré par ultracentrifugation (10 000 g / 30 min) sur un coussin de saccharose 30% en tampon TNE. Le culot est repris dans du tampon TNE et purifié par une ultracentrifugation sur un gradient linéaire de 20 à 50% de saccharose (100 000 g / 16h). La bande virale est prélevée, culottée par ultracentrifugation dans du tampon TNE et finalement reprise dans 400µl de TNE (schéma de purification du virus à partir d'organes : Figure 6).

Un aliquote de la bande virale à l'équilibre est prélevé dans le gradient de saccharose et analysé au réfractomètre.

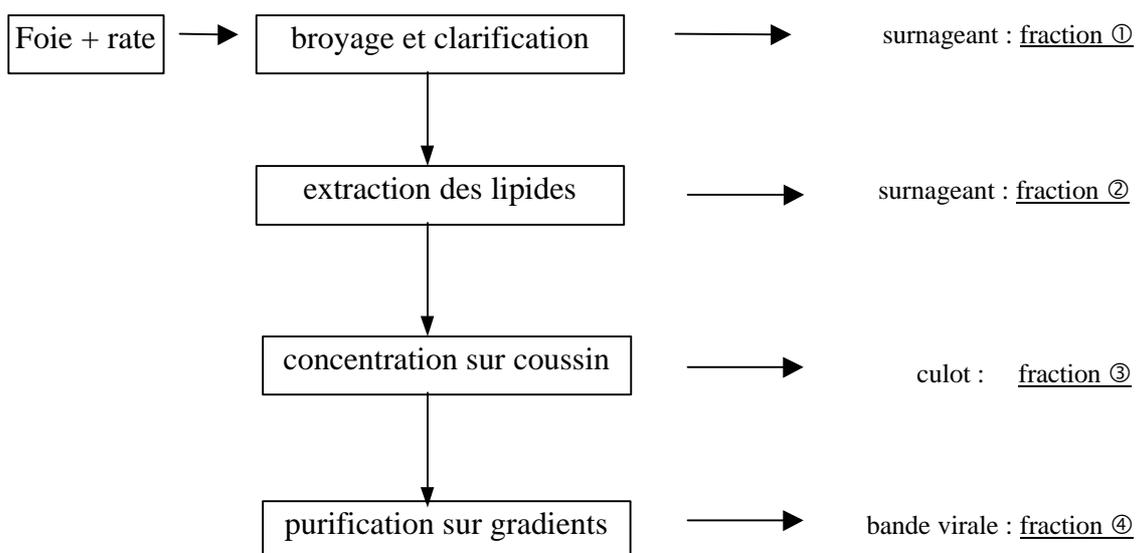


Figure 5 : protocole de purification du virus à partir d'organes. Les fractions ① à ④ sont testées sur oisons.

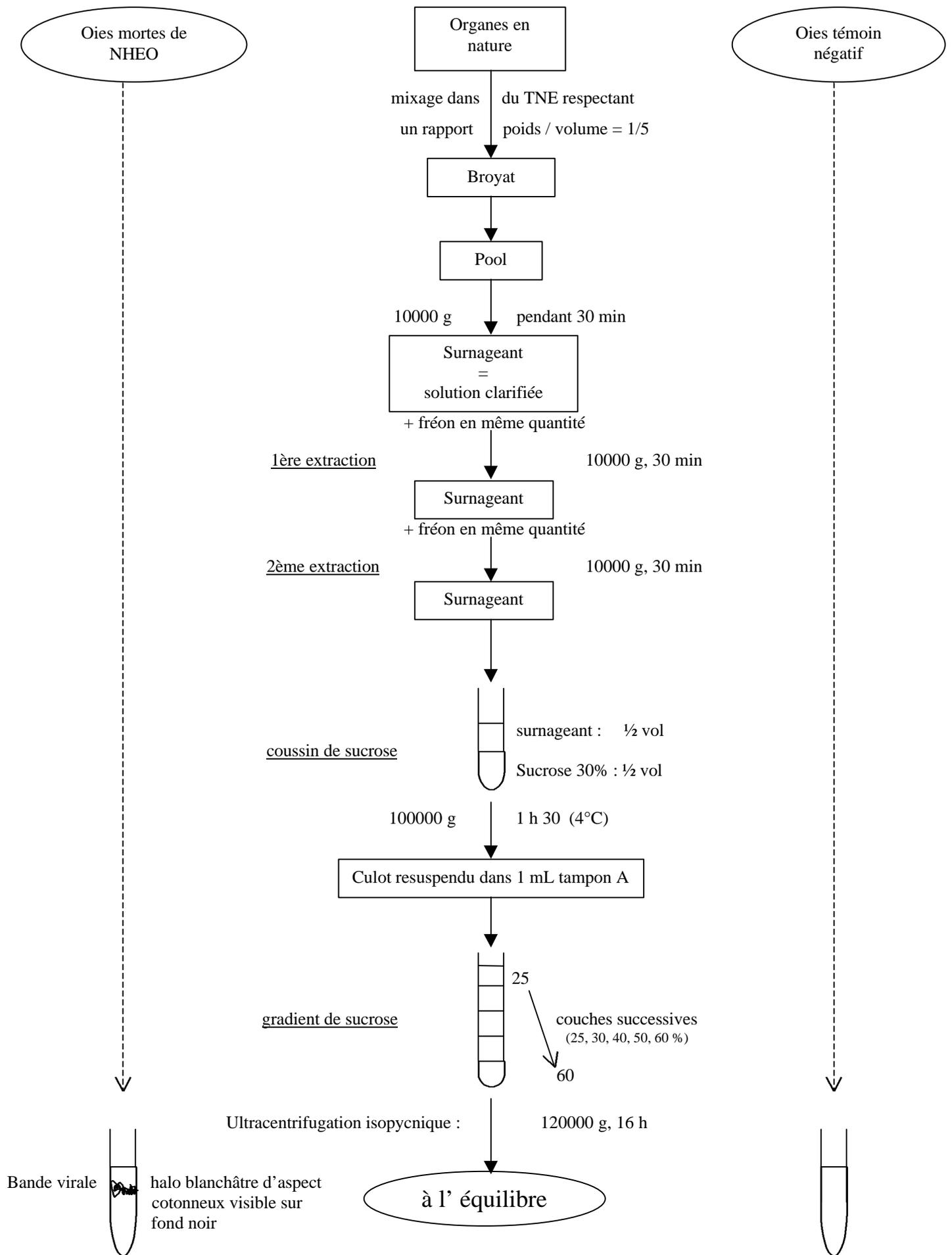


Figure 6 : schéma de purification du virus NHEO à partir d'organes

I.3. Adaptation du virus à la culture cellulaire et immunofluorescence

I.3.1. Culture du virus.

Le virus est adapté sur cellules épithéliales de reins d'oisons, préparées à partir d'un oison d'un jour conventionnel et cultivées en milieu minimum de Eagle, avec 10% de sérum de veau fœtal supplémenté en antibiotiques (pénicilline 100 UI/ml, streptomycine 100 µg/ml). Le lendemain de la confluence des cellules, le tapis cellulaire est infecté : 10 µl de la solution virale purifiée diluée dans 1 ml de milieu de culture sont utilisés comme inoculum. Celui-ci est adsorbé pendant 2 heures puis rincé à l'aide de 10 ml de milieu de culture contenant 5 % de sérum de veau fœtal. Quotidiennement, on observe l'effet cytopathogène au microscope. 5 à 10 jours après infection, les cellules sont congelées et soumises à un protocole de purification dérivé de celui décrit précédemment (Cf. I.3.3.). L'inoculum viral testé sur oisons correspond à un lysat clarifié de cellules infectées, obtenu après une série de 3 congélation-décongélation. Un aliquote de virus purifié est soumis à un traitement thermique à 55°C pendant 1 heure pour évaluer sa résistance à la chaleur.

I.3.2. Détection des antigènes viraux par immunofluorescence

Les antigènes viraux sont détectés sur les cellules infectées à l'aide de sérum d'oisons d'un jour issus de reproductrices ayant subi un épisode de NHEO au cours de leur phase d'élevage. Cinq jours post-infection, les cellules sont fixées dans une solution de paraformaldehyde à 4%, puis perméabilisées au Triton X-100 à 0,1% pendant 30 min, puis incubées avec le sérum primaire. Après 3 rinçages en tampon PBS (Phosphate Buffer Saline), les cellules sont incubées avec un anticorps secondaire anti-IgY de canard, marqué à l'isothiocyanate de fluorescéine (TEBU), dilué au 1/100^e. Les préparations sont montées sous lamelle et examinées au microscope à fluorescence.

I.3.3. Protocole de purification virale à partir de lysats de cultures cellulaires

3 boîtes de 225 cm² contenant chacune un tapis de cellules de reins d'oisons (dénommées par la suite GKT, pour *Goose Kidney Toulouse*) sont inoculées avec le lysat d'un quatrième passage du virus sur culture cellulaire. Huit jours postinfection, après avoir récolté le milieu, on dissocie le tapis infecté par 3 séries de congélation -décongélation dans 20 ml de tampon B.

<u>Composition du tampon B :</u>	{	Tris HCl	10 mM	(pH = 7,2)
		NaCl	50 mM	
		CaCl ₂	0,01 mM	
		Triton X-100	1 %	

Le milieu et les cellules détachées dans le tampon B sont mélangés et centrifugés à 10000 g pendant 30 min. Le surnageant S1 est collecté; le culot, quant à lui, est remis en suspension dans 10 ml de tampon B pour être à nouveau centrifugé à 10000 g pendant 30 min. Le surnageant S2 ainsi obtenu est mélangé avec S1 pour être ultracentrifugé à 100 000 g pendant 2 heures. Le culot est remis en solution dans 30 ml de tampon C

<u>Composition du tampon C :</u>	{	Tris HCl	10 mM	(pH = 7,2)
		NaCl	50 mM	
		CaCl ₂	0,01 mM	
		Triton X-100	1 %	

Cette solution concentrée est soumise à une ultracentrifugation isopycniqne sur un gradient linéaire de saccharose (Cf. I.2.). Les solutions de saccharose sont réalisées dans du tampon C.

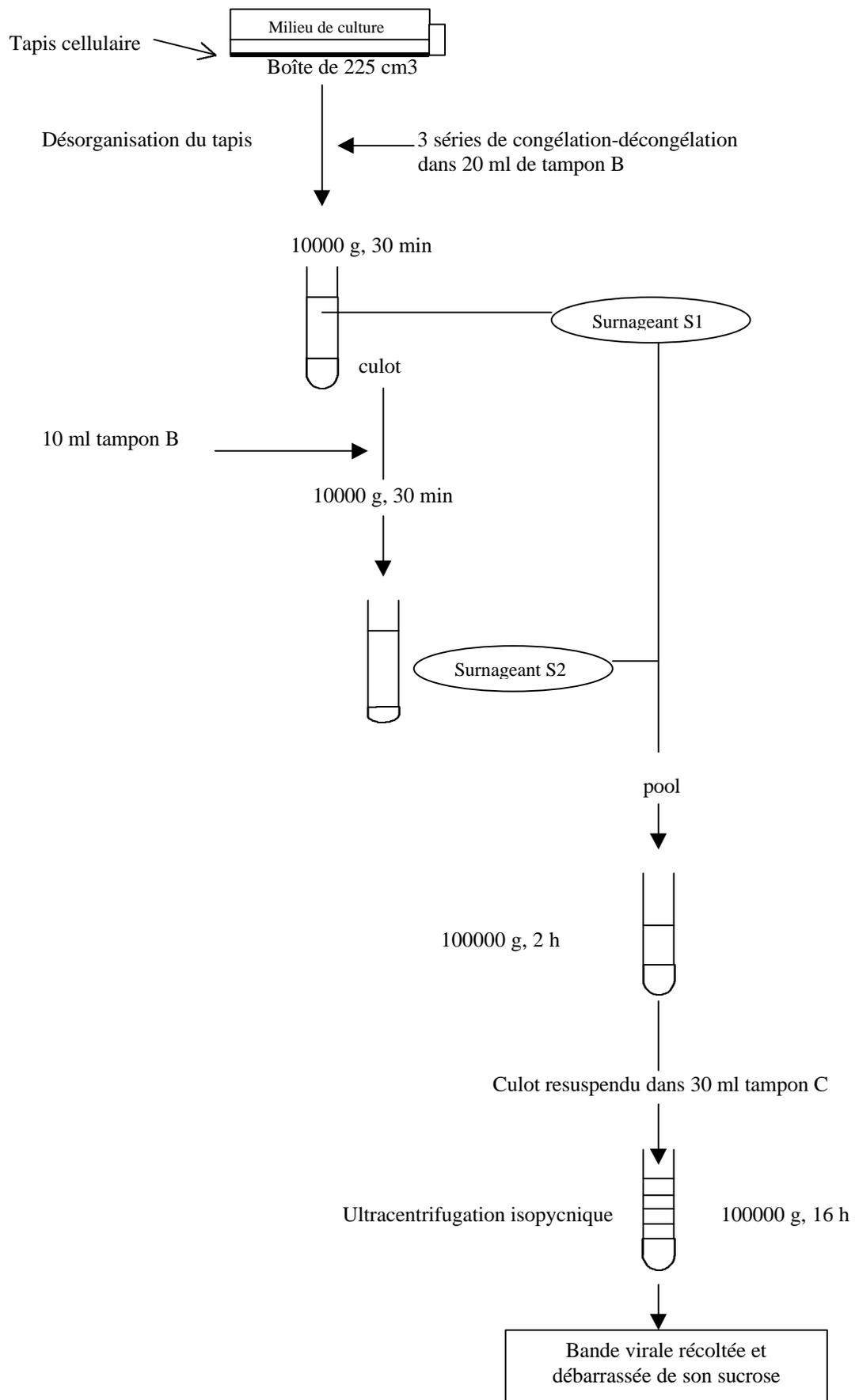


Figure 7 : schéma de purification du virus NHEO à partir de la culture cellulaire

I.4. Microscopie électronique

I.4.1. Visualisation du virus à partir d'organes purifiés

On observe en microscopie électronique les fractions purifiées sur un gradient de saccharose en ultracentrifugation isopycnique. Une goutte de la suspension virale (fraction ④) est déposée sur une grille en cuivre recouverte d'une membrane de carbone (300 mesh, Electron Microscopy Sciences) pendant une minute. Les particules virales sont ainsi adsorbées dans les puits. La grille est ensuite colorée négativement par application d'une goutte d'acide phosphotungstique à 2% en tampon PBS à pH 7,4 pendant 30 s à 1 min. L'excès de colorant est alors absorbé sur du papier filtre puis la grille est séchée. Les observations sont réalisées à l'aide d'un microscope électronique Hitachi HU-12A, à 75 KV et à un grossissement de x 150 000.

I.4.2. Visualisation du virus dans les cellules infectées

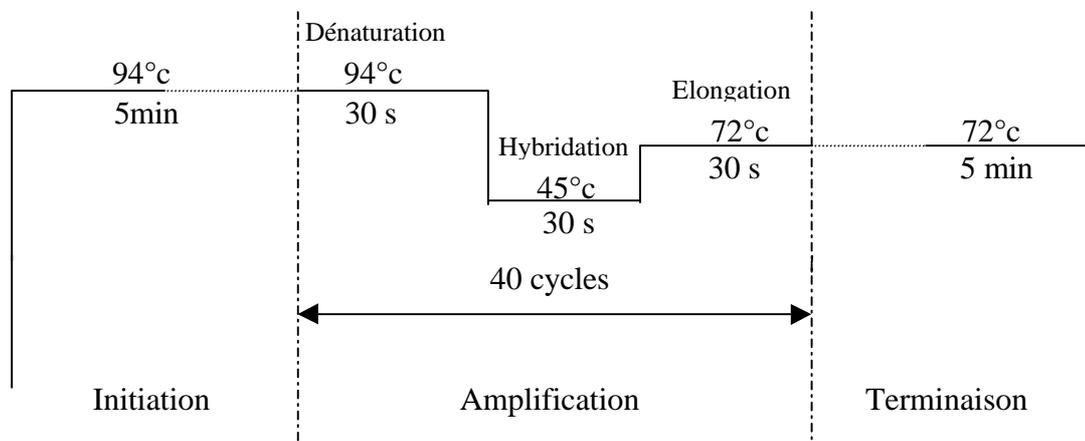
Des cellules primaires de reins d'oisons sont examinées en microscopie électronique : 5 jours après infection avec le virus purifié, les cellules sont grattées sur leur support, fixées dans 2 % de glutaraldehyde tamponné, additionné de tetroxyde d'osmium, puis incluses en résine, soumises à une coupe ultrafine (70 nm) et à une coloration positive à l'acétate d'uranyl à 5% (20 min) et au citrate de plomb (10 mn). Les observations sont effectuées au microscope électronique Hitachi HU-12A à un grossissement de x 25 000.

I.5. Analyse moléculaire : extraction, amplification et séquençage de l'acide nucléique viral

Les acides nucléiques viraux sont extraits de fractions virales purifiées ou de tissus infectés, à l'aide du kit commercial *high pure PCR template preparation kit* (Roche Diagnostics). L'amplification par polymérisation en chaîne (PCR) est effectuée avec des amorces 10-mers (Pharmacia) utilisées en amorçage aléatoire, à faible stringence (hybridation à basse température). La température d'hybridation est de 45°C et le temps d'élongation de 30 secondes. Les réactions de 20 µl décrites ci-dessous sont placées dans un thermocycleur (Gene Amp PCR System 2400 ; Perkin Elmer). L'amplification génomique est obtenue au bout de 40 cycles.

<u>Echantillon 20 μl :</u>	ADN extrait 4 Bases	dGTP	} 10 μ M
		dCTP	
		dATP	
		dTTP	
	DNA Taq polymérase	1 U	
	Amorces aléatoires	10 μ M	
	MgCl ₂	2,5 μ M	
Eau	QSP 20 μ l		

Programmation du thermocycleur

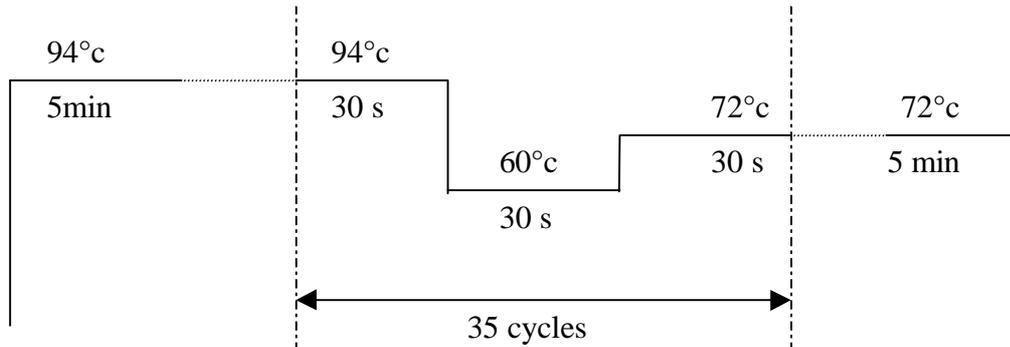


Les produits de PCR sont ensuite clonés en vecteur pGEM-T (Promega Corp.) grâce à la propriété particulière de la Taq polymérase de créer des extrémités adénylées en fin d'amplification. La séquence amplifiée, dont les extrémités sont adénylées, est clonée dans un plasmide pGEMT grâce à la transformation de bactéries compétentes. L'insert est ensuite séquencé à l'aide d'amorces universelles présentes aux bornes du site de clonage du vecteur (Sanger *et al.*, 1977). Les séquences d'ADN obtenues sont analysées avec le logiciel de biologie moléculaire DNASTRIDER®. Un cadre de lecture ouvert est identifié sur cette séquence; le polypeptide déduit est homologue avec une séquence de la protéine VP1 des polyomavirus. Un couple d'amorces spécifiques de la séquence obtenue est choisi au sein du gène VP1 pour obtenir un amplicon de 144 pb. L'amplification génomique est ici constituée de 35 cycles réalisés en forte stringence (T° d'hybridation = 60°C) à partir de l'ADN extrait de la solution ④ purifiée.

Couples d'amorces spécifiques

VP1F 5'__GAGGTTGTTGGAGTCACCACAATG__3'
VP1R 5'__ACAACCCTGCAATTCCAAGGGTTC__3'

Programmation du thermocycleur



Un aliquote du produit d'amplification par PCR est déposé sur gel. Après migration, on visualise un fragment de 144 pb que l'on ne retrouve pas dans l'échantillon témoin négatif.

I.6. Alignements et analyse phylogénétique de la séquence de la VP1

La séquence est soumise à la base de données Genbank pour rechercher les séquences homologues en consultant le serveur NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). La séquence polypeptidique de la VP1 est alignée avec celle des autres polyomavirus à l'aide du logiciel CLUSTAL W (version 1.7). Un arbre phylogénétique est construit à l'aide des logiciels NEIGHBOR et DNAPars. Les arbres ont été construits à l'aide des trois algorithmes les plus courants : « neighbor-joining », « parcimonie » et « probabilité maximum ». Un « bootstrapping » des données est effectué, afin de générer 1000 données par donnée originale. Cette opération a pour effet de renforcer la solidité de l'arbre phylogénétique.

II. RESULTATS

II.1. Reproduction expérimentale de la maladie

La première étape de toute identification d'un agent pathogène consiste en la reproduction expérimentale de la maladie par inoculation. L'inoculation de broyat de foie et rate à des oisons nous a permis de reproduire une mortalité totale des animaux, dans un délai de 6 à 9 jours post-inoculation. Les lésions observées (tableau 1) sont compatibles avec celles classiquement associées à la NHEO (Kisary, 1993). Elles sont en particulier identiques à celles identifiées lors des premiers travaux de recherche sur la NHEO (Sans, 1992). Au cours de l'expérimentation, les 6 oisons témoins n'ont développé aucun signe clinique évocateur de NHEO et ont été sacrifiés après trois semaines d'observation.

Tissus examinés	Lésions observées	Nombre d'oisons atteints
Tissus sous-cutanés	œdème gélatineux	12/12
Cavité abdominale	ascite gélatineuse	12/12
Foie	hypertrophie/congestion	9/12
Rate	hypertrophie/congestion	2/12
Intestin grêle	entérite hémorragique	8/12
Caecum	Typhlite	8/12
Bourse de Fabricius	Hémorragies	2/12
Reins	Congestion	6/12
	Urates	12/12

Tableau 1 : lésions observées sur les animaux inoculés dans le cadre du protocole ①.

De plus l'analyse histologique des organes prélevés sur les sujets morts au cours de la reproduction expérimentale est, elle aussi, cohérente avec le tableau nécropsique associé dans la littérature à la NHEO :

Inflammation de l'interstitium rénal

Nécrose de la muqueuse intestinale

Lyse lymphocytaire (LB) de façon modérée à sévère au niveau de la corticale et de la médulla des follicules bursiques.

Le foie et la rate de tous les animaux inoculés sont prélevés et stockés à -80°C jusqu'à la mise en œuvre du protocole de purification du virus.

II.2. Purification et isolement du virus

Le protocole de purification mis en œuvre sur les organes (foie et rate) d'oies infectées a conduit à une bande blanchâtre visible en gradient isopycnique. D'après l'analyse au réfractomètre de la fraction prélevée, la densité de la bande dans le gradient à l'équilibre, et donc du virus, est de $1,20 \text{ g.cm}^{-3}$ en saccharose. Les inoculations de différentes fractions prélevées au cours du protocole ② (cf I.1) montrent que l'agent infectieux est conservé au cours du processus de purification, jusque dans la fraction purifiée④ (tableau 2).

Inoculum	nombre de morts	délai post-inoculation
Fraction ①	5/6	5 à 8 j
Fraction ②	4/6	6 à 7 j
Fraction ③	6/6	5 à 9 j
Fraction ④	6/6	6 à 9 j
Témoin	0/6	-

Tableau 2 : reproduction expérimentale (protocole②). Mortalité après inoculation de produits de purification du virus à partir d'organes d'oisons infectés.

purification (figure 1) : ① broyat de foie et rate clarifié, ② surnageant après extraction au Fréon, ③ virus concentré sur un coussin de saccharose, ④ virus purifié sur gradients de saccharose.

II.3. Observations en microscopie électronique des particules purifiées

L'examen de la suspension de virus purifié au microscope électronique nous a permis de mettre en évidence des particules sphériques de 45 à 50 nm de diamètre, non enveloppées (figure 8).

Il s'agit donc d'un petit virus, non-enveloppé, peu dense ($d = 1,20 \text{ g.cm}^{-3}$) : ces caractéristiques évoquent un virus de type « papova-like » (Shah, 1996). L'examen de plusieurs prélèvements ne nous a pas permis d'observer d'autres types de particules virales.

II.4. Adaptation du virus à la culture cellulaire

Deux types cellulaires ont été établis au laboratoire et testés pour leur capacité à propager le virus :

Dans un premier temps, un essai de culture a été réalisé sur fibroblastes d'embryon d'oie (cellules d'embryon d'oie à 21J d'incubation). Au cours des 5 passages viraux successifs sur ce système cellulaire, nous n'avons observé aucun effet cytopathogène (ECP). Un lysat de fibroblastes à l'issue du 5^{ème} passage viral est inoculé à des oisons d'un jour : 21 jours post-infection, aucune mortalité ni signe clinique de NHEO n'ont été observés.

Un autre système cellulaire, dérivé de cellules de reins d'oison d'un jour (GKT, pour *Goose Kidney Toulouse*), a également été inoculé avec un broyat d'organes infectés : dès le premier passage, les cellules infectées ont présenté entre 5 et 10 jours post-infection un effet cytopathogène caractérisé par une ballonnisation, un bourgeonnement à partir de la membrane plasmique, conduisant au décollement de la couche cellulaire. L'ECP est maximal 10 à 12 J post-infection, il se caractérise par l'agrégation de cellules détachées, de vésicules et d'autres fragments cellulaires formant une image au microscope ressemblant à une grappe de raisins. Il est à noter qu'au 50^{ème} passage en culture, les cellules GKT sont encore sensibles à l'infection virale.

L'examen en immunofluorescence réalisé sur les cellules rénales infectées après marquage par un mélange de sérums d'oisons issus d'oies infectées a montré la présence massive d'antigènes viraux dans le noyau des cellules infectées, alors que les cellules témoins non-infectées ne présentaient aucune fluorescence (Figure 9).

L'observation en microscopie électronique réalisée sur les cellules infectées 5 jours post-infection confirme la présence massive de particules virales accumulées dans le noyau, alors que des vacuoles sont observées dans le cytoplasme (Figure 10).

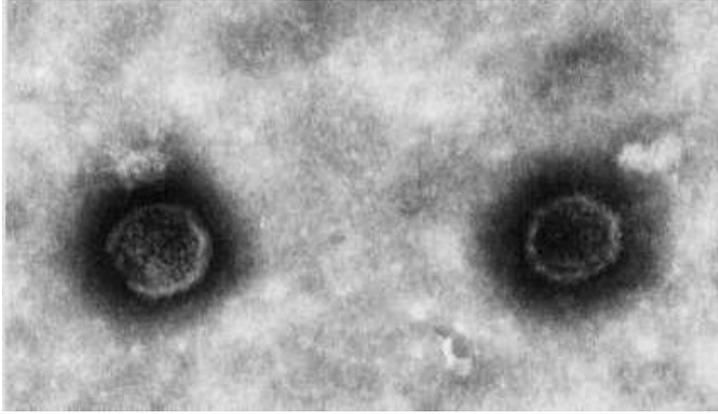


Figure 8 : particules virales visibles en microscopie électronique (x 150000)

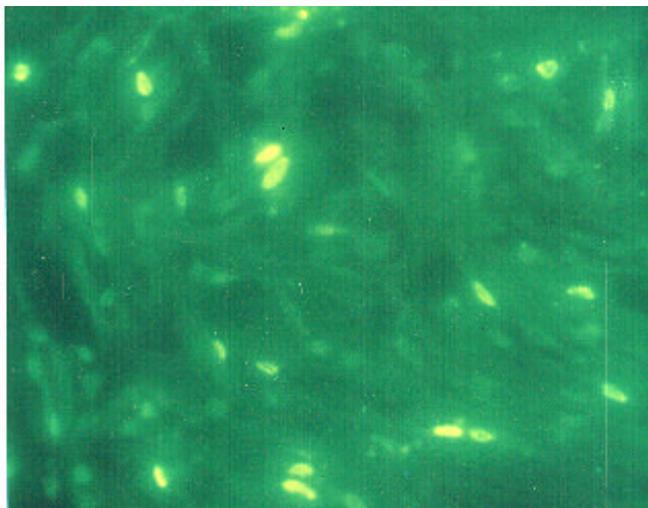


Figure 9 : cellules rénales infectées visualisées en immunofluorescence indirecte

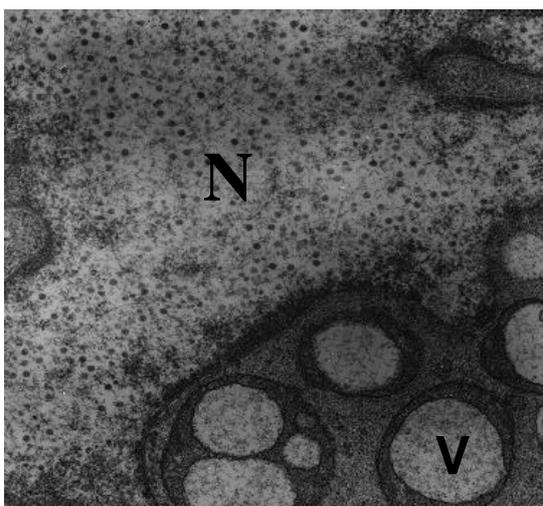


Figure 10 : cellules rénales en culture, infectées par le virus NHEO, observées en microscopie électronique. Noter les nombreux virions dans le noyau N, et les vacuoles (V), x 25 000.

Ces observations suggèrent une réplication intranucléaire, ce qui est fortement compatible avec la biologie de plusieurs familles de virus à ADN. Les fractions purifiées à partir de cultures cellulaires infectées présentent un pouvoir infectieux, même après traitement à 55°C pendant une heure (Tableau 3). Cette résistance à la chaleur est incompatible avec la présence d'une enveloppe à la surface du virus.

Inoculum (400µl)	Nb total d'oisons	Nb d'oisons survivants	
		8 jours p.i	21 jours p.i
Broyat organes témoins	10	10	10
Cellules non-infectées	10	10	10
Lysat du 5 ^{ème} passage viral sur fibroblastes d'embryon d'oie	10	10	10
Broyat organes infectés	20	0	0
Virus purifié de tissus	20	0	0
Virus purifié de culture cellulaire (GKT)	20	0	0
Virus traité à 55°C / 1h	9	0	0

Tableau 3 : reproduction expérimentale de la NHEO (protocole ②)

II.5. Analyse moléculaire

Les acides nucléiques extraits des fractions purifiées ont été soumis à une amplification par PCR. Notre approche a consisté à amplifier de manière aléatoire un fragment d'acide nucléique présent dans les fractions purifiées : nous avons ainsi obtenu un amplicon de 1175 paires de base (pb). Après séquençage de ce fragment, une comparaison de séquence avec les banques de données informatiques nous a indiqué une similarité avec le gène codant pour la protéine VP1 de plusieurs polyomavirus. Des amorces spécifiques (VP1F et VP1R) de ce fragment ont été dessinés et synthétisés. Une amplification par PCR a ensuite été effectuée, avec ce couple d'amorces spécifiques, sur différents tissus prélevés à l'occasion de cas spontanés de NHEO observés en élevage, sur des reproductions expérimentales réalisées en animalerie et sur des extraits de culture cellulaire. L'amplification du produit de 144 pb correspondant au couple VP1F-VP1R confirme la corrélation stricte entre la présence de l'agent de la NHEO et cette séquence de polyomavirus (Figure 11).

1 2 3 4 M 5 6 7 8

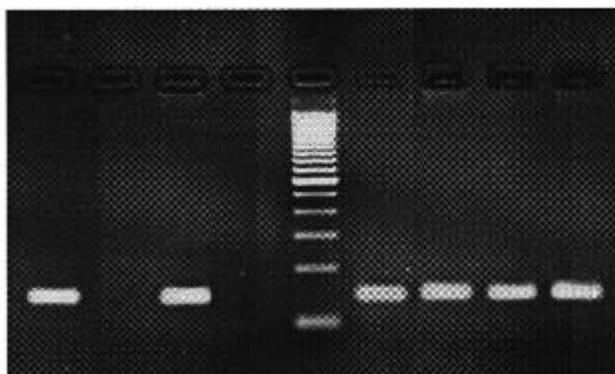


FIGURE 11 : amplification de l'ADN viral par PCR. Un couple d'amorces spécifiques permet l'obtention d'un amplicon de 144 pb. Acides nucléiques purifiés à partir de foie d'oison infecté (1) ou contrôle (2) ; virus purifié à partir de culture cellulaire infectée (3) ou contrôle (4) ; prélèvements de foie et rate d'oies infectées sur le terrain (5 à 8 : février 1991, janvier 1998, Mars 1998, Mars 1999). M : marqueur de poids moléculaire.

En effet, l'amplification, systématique à partir d'animaux ou de cellules infectés, n'a pu être obtenue avec les animaux ou les systèmes cellulaires contrôles non-infectés.

Sur la base de l'ensemble des données biologiques, physico-chimiques ou génétiques recueillies à ce stade, nous avons donc identifié l'agent de la NHEO comme un virus de la famille des *Polyomaviridae*.

L'analyse informatique de séquence de 1175 pb a montré que la séquence nucléotidique de la VP1 du virus de la NHEO présente 50 à 59% d'identité et 63 à 72% de similarité avec la VP1 de 7 polyomavirus (Tableau 4).

Virus	%	%	N° d'accension à la base
	Identité	similarité	<i>Genbank</i>
BK	53	73	Z 19536
SV 40	57	72	AF 038616
BFDV	56	71	M 20775
JC	54	70	AF 015537
LPV	55	69	M 14494
<i>Hamster Polyomavirus</i>	54	69	P 03092
<i>Mouse Polyomavirus</i>	52	69	M 55904

TABLEAU 4 : comparaison globale de la séquence en aminoacides de la VP1 du virus NHEO et de 7 polyomavirus : pourcentage d'acides aminés identiques (% identité) ou présentant les mêmes caractéristiques physico-chimiques (% similarité). Pour chaque séquence virale, le numéro d'accension à la banque de données informatique *Genbank* est précisé.

Six blocs d'acides aminés de la séquence polypeptidique déduite sont intégralement conservés chez le virus de la NHEO comme chez tous les membres du genre *Polyomavirus*. Des résidus sont retrouvés systématiquement en même position, ce qui indique leur importance structurale et / ou fonctionnelle.

La construction de l'arbre phylogénétique sur la base de la séquence de la VP1 a confirmé l'étroite relation génétique entre le virus NHEO et les autres membres du genre *Polyomavirus* (Figure 12). L'ensemble de ces résultats montre cependant que l'agent de la NHEO est un nouveau polyomavirus. Nous proposons pour ce virus la dénomination officielle *Goose hemorrhagic polyomavirus (GHPV)*.

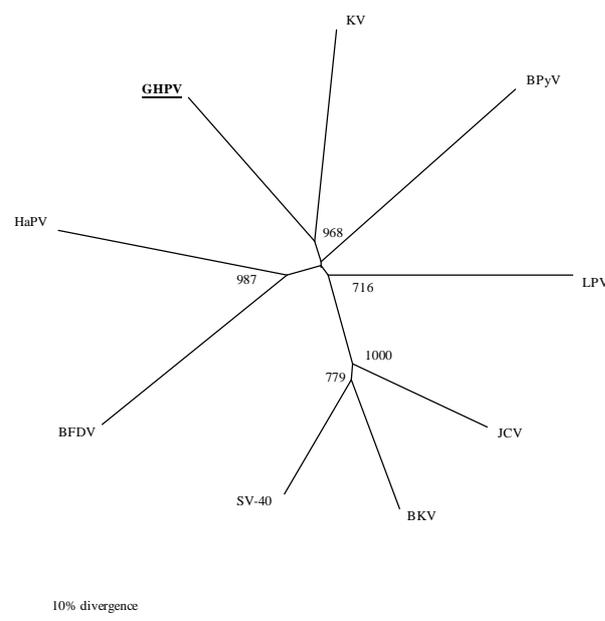


Figure 12 : arbre phylogénétique sur la base VP1 du GHPV et d'autres polyomavirus

III. DISCUSSION

Les reproductions expérimentales confirment le caractère transmissible de la maladie avec un tableau nécropsique compatible avec celui obtenu par les autres auteurs (Bernarth et Szalai 1970 , Schettler 1980 ; Sans 1992).

La purification du virus aboutit à des fractions riches en virions de 40 à 50 nm de diamètre, non-enveloppés, de faible densité; leur affiliation au groupe des « papova-like » d'après ces critères morphologiques semble dès lors pertinente, mais doit être considérée avec précaution en raison des risques d'artefact de coloration.

L'adaptation à la culture cellulaire avait été tentée, sans succès, sur œufs embryonnés et fibroblastes d'embryons (Vuillaume, 1993). Nous avons pu cultiver le virus de la NHEO sur des cellules épithéliales de reins d'oisons. Dans les cellules infectées, les virions sont rassemblés dans le noyau, ce qui évoque une réplication intranucléaire et donc un virus dont le génome est un ADN. Les antigènes viraux sont révélés avec du sérum d'oisons issus d'oies reproductrices ayant subies un épisode de NHEO pendant leur phase d'élevage, ce qui confirme le lien entre le virus cultivé et l'agent de la maladie sur le terrain. L'examen en microscopie électronique confirme la présence de virions en grand nombre dans le noyau et révèle des vacuoles cytoplasmiques atypiques. Notons que nous n'avons pas pu amplifier le virus de la NHEO sur fibroblastes d'embryon d'oie, alors que ce type cellulaire est particulièrement indiqué pour la culture des polyomavirus aviaires (Bozeman *et al.*, 1981).

La stratégie moléculaire adoptée reposait sur l'amplification aléatoire des acides nucléiques présents dans les fractions «purifiées»; l'efficacité de cette approche dépend de la richesse relative en acide nucléique viral et en éventuels contaminants; notre succès s'explique donc largement par l'obtention d'un matériel viral abondant après purification. La mise en évidence d'une séquence « virale » nécessite ensuite la confirmation du lien entre la séquence et l'agent étiologique. La difficulté possible dans cette phase tient au fait que des animaux peuvent être porteurs sains (le virus peut être beaucoup plus prévalent que la maladie). Comme il n'existe pas d'oisons « EOPS », les travaux expérimentaux ont été réalisés sur des oisons conventionnels, dont on ne connaissait pas *a priori* le statut sanitaire. Dans le cas présent, nous avons pu montrer la stricte association entre la séquence du polyomavirus et l'agent infectieux, que ce soit sur les tissus d'oisons infectés spontanément ou expérimentalement, ou les cultures cellulaires infectées.

L'analyse génétique de l'agent de la NHEO a permis de le classer dans le genre *Polyomavirus*. Ce résultat est parfaitement cohérent avec les autres éléments accumulés au cours de ce travail : petit virus non enveloppé, de 45 à 50 nm de diamètre, à réplication intranucléaire, résistant à la chaleur (Shah, 1996 ; Van Regenmortel, 2000). Sur cette base, nous avons proposé pour cette nouvelle espèce virale la dénomination *Goose hemorrhagic polyomavirus* (GHPV), qui est conforme avec les règles de la nomenclature virale et évite la confusion avec le GPV (*Goose parvovirus*), le parvovirus agent de la maladie de Derszy chez l'oie.

La forte divergence génétique entre le GHPV et le BFDV (identité nucléotidique de 59 %, similarité de 72 %) montre que le GHPV est bien une espèce à part entière et non un variant du BFDV; cette divergence explique d'ailleurs que les amorces spécifiques des polyomavirus aviaires utilisées au départ (Phalen *et al.*, 1991) n'aient pas permis d'amplifier l'ADN du GHPV.

Les polyomavirus sont largement distribués chez les mammifères et les oiseaux, et sont généralement adaptés de manière spécifique à leur hôte (Shah, 1996). Les polyomavirus aviaires ont été identifiés à partir de diverses espèces de psittacidés (Ritchie, 1991). Le polyomavirus aviaire prototype est le BFDV (*Budgerigar Fledgling Disease Virus*), agent d'un syndrome fulgurant chez les jeunes perruches (Bozeman *et al.*, 1981, Müller, 1986, Ritchie, 1991), évoquant par certains aspects la NHEO. Des virus apparentés ont été isolés chez d'autres psittacidés et des oiseaux sauvages, comme les passereaux et les falconidés (Graham, 1987, Johne, 1998, Phalen, 1999). A ce jour, aucun n'avait été associé à une affection des volailles. Un point commun des polyomavirus aviaires est leur pouvoir pathogène intrinsèque : cette propriété contraste fortement avec la biologie des polyomavirus de mammifères qui sont le plus souvent associés à un portage asymptomatique, qui peut être très long (Shah, 1996, Zur Hausen, 1979). Le GHPV se multiplie sur Lymphocytes B (LB) , si l'on se réfère à la lyse lymphocytaire de la medulla de la bourse de Fabricius. Ce tropisme privilégié pour les LB est aussi décrit chez les virus BK, JC (polyomavirus de mammifères) et BFDV (polyomavirus aviaire). L'analyse histologique montre que le GHPV comme le BFDV présentent un spectre cellulaire plus large que les polyomavirus de mammifères, dont la réplication se limite à quelques types cellulaires, voire aux seuls LB (cas du *Lymphotropic polyomavirus*, isolé chez le singe vert).

Cependant l'agent de la NHEO présente des propriétés biologiques originales, en particulier l'absence d'inclusions basophiles intranucléaires typiquement associées à la réplication des polyomavirus : ceci explique en partie que l'identification de ce virus ne soit intervenue que 30 ans après la première description de la maladie. Les variants du BFDV sont par ailleurs

caractérisés par leur large spectre d'hôte (Phalen *et al.*, 1999), ce qui contraste avec l'apparente spécificité du virus NHEO pour l'oie (Sans, 1992). Ce point est en cours d'investigation, notamment en ce qui concerne les autres palmipèdes, pour évaluer leur rôle éventuel dans le portage et la circulation du virus. La pathogénicité de tous les polyomavirus aviaires reflète une caractéristique commune au niveau moléculaire. A travers les différents variants du BFDV, des mutations ponctuelles ont été observées sur les 2 gènes de capsid VP2 et VP3. Ces mutations expliqueraient les différences histopathologiques et même la spécificité du spectre d'hôte.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les travaux de recherche menés à l'ENVT avaient pour objectifs d'isoler et identifier clairement l'agent de la NHEO; d'adapter ce virus sur un système cellulaire, se dispensant ainsi de la purification virale à partir d'organes qui est lourde et fastidieuse. L'amplification génomique d'un fragment de 144 paires de base à l'aide d'amorces spécifiques constitue à ce stade un outil diagnostique susceptible d'identifier un portage asymptomatique ou de confirmer une suspicion clinique; dès lors les perspectives de recherche s'élargissent :

- Prévention de la NHEO par des mesures sanitaires :

Sur le plan de la maîtrise sanitaire de l'infection naturelle, le GHPV est un virus très résistant dans le milieu extérieur : il résiste à une température de 55°C pendant une heure, les solvants des lipides ne l'inactivent pas et il ne craint pas la dessiccation. Sachant aussi qu'il existe un portage asymptomatique des animaux ayant survécus à un épisode de NHEO, les protocoles de nettoyage-désinfection rigoureux et adaptés avec respect stricte du vide sanitaire doivent d'emblée être scrupuleusement respectés ; les dérivés chlorés semblent des désinfectants de choix pour inactiver efficacement le virus (Ritchie *et al.*, 1993).

Le contrôle de la NHEO sur le terrain ne peut pas être fondé uniquement sur la détection et l'éradication des lots porteurs du virus, car l'incidence de la maladie est actuellement très forte et les premiers résultats montrent une forte circulation virale dans les élevages. La seule solution acceptable dans la situation actuelle repose sur la vaccination.

- Prophylaxie médicale de la NHEO :

La vaccination de troupeaux de reproducteurs avec un vaccin inactivé et adjuvé induit la production d'anticorps passifs neutralisants et protecteurs chez le jeune oison. Cette vaccination a donc *a priori* toutes les chances de protéger un oison contre une infection naturelle dans la période du démarrage. D'ailleurs cette approche semble *a priori* la plus pertinente et la seule envisageable d'un point de vue pratique. Il sera peut-être nécessaire d'envisager une vaccination « relais » des oisons prêts à gaver pour assurer une protection pendant toute la durée de vie économique des oies prêtes à gaver.

Le recours à la vaccination doit donc être conçu comme un outil d'urgence, d'utilisation ciblée, destiné à permettre à terme l'application de mesures de contrôle essentiellement fondées sur la prophylaxie sanitaire, lorsque la prévalence de l'infection aura décliné de manière significative. En toute hypothèse, il est clair qu'un éventuel vaccin ne devra être considéré que comme un des outils de la maîtrise sanitaire, et ne saurait se substituer au respect des règles d'hygiène, qui doivent dès à présent s'appliquer avec une grande rigueur, tant en multiplication qu'en production.

- Précision sur l'épidémiologie :

La connaissance fine de l'épidémiologie de la NHEO est un autre enjeu à relever : elle conditionne la pertinence et l'efficacité d'une stratégie globale de maîtrise de la maladie. La mise au point d'un test sérologique de type ELISA permettra de déterminer le statut de chaque élevage afin de limiter par les précautions mises en œuvre et au besoin par la vaccination, la propagation du virus à l'intérieur de l'élevage mais aussi à l'extérieur.

Outre la détermination des modes de transmission du virus (horizontale et / ou verticale ?), des recherches de portage du virus sur les espèces telles que le canard domestique, le canard et l'oie sauvages sont engagées, pour identifier d'éventuels réservoirs du virus.

Ce présent travail constitue donc une première étape dans la maîtrise globale de la N.H.E.O. D'autres contributions permettront de mieux cerner les nombreuses zones d'ombre qui demeurent...

TABLE DES ILLUSTRATIONS

	Page
Figure 1 : schématisation du système prêt à gaver (PAG)	4
Figure 2 : position caractéristique de l'oison mort de NHEO	15
Figure 3 : photo de l'ascite et de l'œdème gélatineux	15
Figure 4 : photo de l'entérite hémorragique avec foyers de nécrose	15
Figure 5 : protocole de purification du virus à partir d'organes	21
Figure 6 : schéma de purification du virus NHEO à partir d'organes	22
Figure 7 : schéma de purification du virus NHEO à partir de la culture cellulaire	25
Figure 8 : particules virales visibles en microscopie électronique (x 150000)	32
Figure 9 : cellules rénales infectées visualisées en immunofluorescence indirecte	32
Figure 10 : cellules rénales en culture, infectées par le virus NHEO, observées en microscopie électronique	32
Figure 11 : amplification de l'ADN viral par PCR	34
Figure 12 : arbre phylogénétique sur la base VP1 du GHPV et d'autres polyomavirus	36
Tableau 1 : lésions observées sur les animaux inoculés dans le cadre du protocole ①	29
Tableau 2 : reproduction expérimentale de la maladie par inoculation des 4 fractions purifiées lors du protocole②	30
Tableau 3 : reproduction expérimentale par inoculation de broyats d'organes, de lysats cellulaires et test de résistance du virus à la chaleur	33
Tableau 4 : comparaison globale de la séquence en aminoacides de la VP1 du virus NHEO et de 7 autres polyomavirus	35

REFERENCES

- Bernath S., and Szalai F. 1970. Investigations for clearing the etiology of the disease appeared among goslings in 1969. Magyar. Alla. Lap. 25:531-536.
- Bozeman L.H., David R.B., Gaudry D., Luckert P.D., Fletcher O.J., Dykstra M.J. 1981. Characterization of a papovavirus isolated from fledgling budgerigars. Avian Dis. 25:972-980.
- Graham D.L., Calnek B.W. 1987. Papovavirus infection in hand-fed parrots: virus isolation and pathology. Avian Dis. 31:398-410.
- Guerin J-L., Gelfi J., Dubois L., Vuillaume A., Boucraut-Baralon C. and Pingret J-L. 2000. A novel polyomavirus, *Goose hemorrhagic polyomavirus*, is the agent of Hemorrhagic Nephritis Enteritis of Geese. J. Virol. 74:4523-4529.
- Guérin J-L., Gelfi J., Dubois L., Sans P., Fleury H., Vuillaume A. et C. Boucraut-Baralon. Néphrite Hémorragique Entérite de l'Oison (NHEO) : isolement de l'agent viral et perspectives de recherches, 1998. 3^{èmes} Journées de la Recherche sur les Palmipèdes à Foie Gras. Bordeaux
- Guérin J-L., J-L Pingret, L. Dubois, A. Vuillaume, C. Boucraut-Baralon, P. Sans. 1999. Bulletin des GTV. 2:9-10.
- Johne R., and Muller H. 1998. Avian polyomaviruses in wild birds: genome analysis of isolates from falconiformes and psittaciformes. Arch. Virol. 143:1501-1512.
- Kisary J. 1993. Haemorrhagic Nephritis and Enteritis of Geese. p. 513-514. In Virus Infections of Birds (Elsevier Edit.) J-B. Mc Ferran, MS. Mc Nulty, London.
- Muller H., and Nitschke R. 1986. A polyoma-like virus associated with an acute disease of fledgling budgerigars. Med. Microbiol. Immunol. 175:1-13.
- Phalen D.N., V.G. Wilson and D.L. Graham. 1991. Polymerase chain reaction assay for avian polyomavirus. J. Clin. Microbiol. 29 :1030-1037

Phalen D.N., V.G. Wilson J.M. Gaskin J.N. Derr and D.L. Graham. 1999. Avian Dis. 43 : 207-218.

Ritchie B.W. 1991. Avian polyomavirus : an overview. J. Am. Avian.Vet. 3:147-153.

Ritchie B.W, Pritchard N., Pest D., Niagro FD., Latimer KS., Lukert PD. 1993. Susceptibility of avian polyomavirus to inactivation. J.Assoc.Avian Vet. 7(4):193-195.

Sanger F., Nicklen S. and Coulson A.R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 74 : 5463-5467.

Sans P. 1992. Contribution à l'étude de la maladie des jeunes oies. Thèse de Doctorat vétérinaire, Toulouse, France.

Schettler C.H. 1977. Détection en France de la néphrite hémorragique et entérite de l'oie, Rec. Med. Vet. 153: 353-355.

Schettler C.H. 1980. Clinical picture and pathology of haemorrhagic and enteritis in geese. Tier. Prax. 8: 313-320.

Shah K.V. 1996. Polyomaviruses. p. 2027-2043. *In* Fields Virology Third Edition (Lippincott-Ravett Publishers) B.N. Fields et al., Philadelphia.

Stoll R., Luo D., Kouwenhoven B., Hobom G., and Muller H. 1993. Molecular and biological characteristics of avian polyomaviruses: isolates from different species of birds indicate that avian polyomaviruses form a distinct subgenus within the polyomavirus genus. J.Gen. Virol. 74: 229-237.

Szalai, F., and S. Bernath.1971. Investigations for clearing the etiology of the disease appeared among goslings in 1969: II. The elaboration of passive immunization, the production of hyperimmune serum. III. Pathohistological investigations. Magyar. Alla. Lap. 26:420-423.

Takemoto K.K., and Segawa K. 1983. p. 87-96. *In* Polyomaviruses and human neurologic diseases. Alan R. Liss, Inc., New York.

Trudel M., and Payment P. 1980. Concentration and purification of rubella virus hemagglutinin by hollow fiber ultrafiltration and sucrose density gradient. *Can. J. Microbiol.* 26:1334-1339.

Van Regenmortel, M.H.V., Fauquet, C.M. and Bishop D.H.L. (ed.). 2000. *Virus Taxonomy. Classification and nomenclature of viruses. Seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* Academic Press.

Vuillaume A. 1993. La maladie des jeunes oies destinées au gavage : le point sur l'avancement des travaux de recherches. 1^{ères} Journées de la Recherche sur les Palmipèdes à Foie Gras. Bordeaux, p141-150.

Vuillaume A., Tournut J., and Banon H. 1982. A propos de la maladie des oisons d'apparition tardive ou Néphrite Hémorragique-Entérite de l'Oie (N.H.E.O.). *Rev. Med. Vet.* 133: 341-346.

Zur Hausen H., and Gissmann L. 1979. Lymphotropic papovaviruses isolated from African green monkey and human cells. *Med. Microb. Immunol.* 167:137-153.

