

PRÉSENCE D'UNE VARIANTE ONCOGÈNE DU VIRUS DE LA VARIOLE AVIAIRE PARMIS LES SOUCHES DE TERRAIN AU SÉNÉGAL

EXISTENCE OF ONCOGENIC VARIANTE OF FOWLPOX VIRUS AMONGFIELDSTRAINS IN SENEGAL

NDEYE FATOU TALL NDIAYE^{1*}, EL HADJI TRAORE², MAME AMINATA CISSE¹, MARIANE AIDARA¹ ABDOULAYE DIENG³

RÉSUMÉ

La variole aviaire apparait de plus en plus au Sénégal sous une forme très aigue, avec des lésions invasives et persistantes dues à la présence du virus de la réticuloendothéliose (plus connue sous le vocable anglo-saxon REV) dans le génome du virus de la variole aviaire. Pour mieux caractériser l'agent étiologique de ces flambées de variole, une analyse par PCR conventionnelle a été réalisée sur trente échantillons de terrain divisés en quatre types de souches notés : S20, S21, S22, et S23. Le test PCR se révèle positif pour la détection du gène p4bdu virus de la variole aviaire dans tous les échantillons. La détection du génome rev présente quant à elle une certaine hétérogénéité, on ne le retrouve que dans les échantillons S20 et S21. Des poulets de quinze jours infectés avec la S20, montrent des lésions atypiques de variole avec des signes caractéristiques d'infection du REV, alors qu'une infection de sujets avec la S21 ne conduit qu'à une infection classique de variole. Ces résultats montrent que le gène rev qui se trouve dans la S20 est compétent, ce qui conduit à une co-infection, tandis que le gène rev qui se trouve dans la S21 semble silencieux, ce qui fait que la S21 se comporte comme les souches S22 et S23 qui en sont dépourvues.

Mots-clés : variole, réticuloendothéliose, virus, Sénégal

ABSTRACT

Fowlpox disease increases in Senegal with an acute, invasive and persistent form of lesions. To determine the etiological agent of the outbreaks, a conventional polymerase chain reaction was performed to examine samples S20, S21, S22 and S23 from field cases of fowlpox. PCR assay was positive for p4b gene of fowlpox in all samples but the detection of full length rev integration in samples display variability. S20 and S21 isolates were positive while S22 and S23 were negative. The inoculation of fifteen days old chickens with S20 induced atypical lesions of fowlpox and showed characteristic clinical signs of Reticulo-endotheliosis virus (REV) infection. Inoculation with S21 led to characteristic fowlpox lesions only. These results suggest that integrated rev in S20 is competent and can lead to co-infection whereas integrated rev in S21 is not replicative and behaves as rev free fowlpox isolates like S22 and S23.

Keywords: fowlpox, reticuloendotheliosis virus, isolate, Senegal

1 : ISRA-Unité de production de vaccins, B P 2057 Dakar-Hann Sénégal ;

2 : ISRA-Laboratoire national de l'élevage et de recherches vétérinaires ; B P 2057 Dakar- Hann Sénégal

3 : Université de Thiès-Ecole nationale supérieure d'agriculture BP A 296 – Thiès- Sénégal

Auteur correspondant : Ndeye Fatou Tall NDIAYE : ISRA-Unité de production de vaccins, B P 2057 Dakar-Hann Sénégal ; ndeyefatou@hotmail.com

INTRODUCTION

La variole aviaire est en recrudescence au Sénégal avec une forme particulièrement aigüe et persistante de la maladie, ce qui conduit à d'importantes pertes économiques.

En effet, classiquement la variole aviaire se présente sous deux formes : une forme cutanée dite sèche généralement peu grave et une forme diphtérique dite humide plus sévère [1]. Il arrive également, que les infections à Poxvirus se manifestent sous une forme systémique voire oncogénique [2]. La forme oncogénique est caractérisée par des lésions au niveau du réticulum endothélial des cellules du foie, de la rate et des autres organes internes [3]. Cela a été récemment confirmé en Chine, où suite à des épisodes récurrents de variole dans les élevages avicoles, il est apparu une forme atypique de variole aviaire avec des lésions immunosuppressives chez les volailles atteintes [4]. Le diagnostic révéla la présence de gènes du virus de la réticuloendothéliose (REV) dans le génome du virus de la variole. Il semblerait que lorsqu'il y a intégration de gènes rev dans le génome du virus de la variole aviaire (VVA), la pathogénicité du virus de la variole est considérablement accrue [5].

Le virus de la réticuloendothéliose est considéré comme un contaminant naturel du virus de la variole aviaire [6]. Il appartient au groupe des rétrovirus, induit une forme proliférative et invasive de la maladie chez les oiseaux sensibles. La présence de gènes rev est mise en évidence grâce à la technique d'amplification par PCR [7]. Au Sénégal, aucun cas d'infection de variole associée au virus de la réticuloendothéliose n'a jamais été reporté. Cet article relate les phases d'une infection expérimentale de poulets, par des virus de variole aviaire, porteurs ou dépourvus de gènes rev. Ainsi, des échantillons de souches de terrain ont été prélevés entre 2016 et 2018 à Dakar et sa banlieue, sur des poulets atteints de variole. Ils ont été soumis à une caractérisation moléculaire pour bien identifier les souches collectées, puis ces souches ont fait l'objet d'une infection expérimentale sur des poulets sains. Cela a permis de caractériser les souches de variole aviaire et de décrire pour la première fois au Sénégal, les lésions caractéristiques consécutives à une co-infection VVA-REV.

1. MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les échantillons de terrain : quatre variantes du virus de la variole aviaire (S20, S21, S22 et S23) ont été prélevées sur des poulets qui présentaient des pustules cutanées sur la crête et le contour des yeux.

Préparation des échantillons

Les échantillons collectés ont été triturés séparément dans une solution saline de tampon phosphate (Fisher Bio Reagents, Waltham/Massachusetts, USA) à pH 7.4, contenant 0,1% d'antibiotiques (mélange prêt à l'emploi de Pénicilline/Streptomycine/Fungizone 100X /CN 3921 Highveld Biological (PTY) LTD, Johannesburg/South Africa). Ces différentes suspensions virales ont ensuite été filtrées individuellement au moyen de filtre Millipore 0,45 µm de diamètre (Merck Millipore, Burlington, Massachusetts/USA) et conservées au congélateur à -20°C. Ces filtrats ont servi à l'inoculation d'œuf embryonnés de poule âgés de 10 jours, exempts d'organismes pathogènes spécifiques (EOPS). L'inoculation s'est faite en déposant 0,1ml d'inoculum à la surface de la membrane chorio-allantoïdienne (CAM) avant de reboucher l'orifice avec de la cire de bougie chauffée et les œufs ainsi inoculés étaient incubés à +37°C, durant 5 jours. Ils

étaient examinés quotidiennement pour vérifier la vitalité des embryons. A la fin du temps d'incubation, les œufs qui contenaient des embryons vivants étaient ouverts à l'aide de ciseaux stériles, dans des conditions d'asepsie totale et la CAM de chaque œuf était prélevée puis finement hachée pour faciliter l'extraction de l'ADN viral.

Extraction de l'ADN et analyse par PCR des échantillons

L'extraction des ADN viraux était effectuée en utilisant le kit QIAGEN Dneasy (DNA Mini Kit 50), conformément aux recommandations du fabricant (Qiagen-Hilden/Germany). L'amplification de l'ADN ou PCR est faite en ciblant une région précise du génome du VVA et celui du REV grâce à des amorces spécifiques [5] (Tableau I). Trois tests PCR étaient réalisés sur chaque échantillon d'ADN suivant les conditions décrites par Masola [8].

Tableau I : Caractéristiques des amorces utilisées

Amorce	Taille en <u>pb</u>	Séquences [5]
Gène <i>p4b</i>	578	A1 : CAGCAGGTGCTAAACAACAA
		A2 : CGGTAGCTTAACGCCGAATA
Gène <u>revent</u>	807	A3 : TGACCAGGCGGGCAAAC
		A4 : CGAAAGGGAGGCTAAGACT
Gène <u>rev 5'itr</u>	370	A5 : ACCTATGCCTCTTATTCCAC
		A6 : CTGATGCTTGCCTTCAAC

Protocole expérimental d'infection des poulets

Des poussins âgés d'un jour (n = 40), étaient élevés au laboratoire pendant 15 jours avant d'être divisés en cinq groupes, puis infectés suivant le protocole expérimental décrit dans le tableau II. Tous les poulets étaient examinés quotidiennement et les manifestations cliniques étaient enregistrées durant les trois semaines post infection (p.i).

Tableau II: Protocole expérimental d'infection des poulets avec les différentes souches sauvages de variole

Groupe 1 (témoins)	8 poulets inoculés avec 0.2ml de PBS pH 7.4 au niveau de la crête
Groupe 2	8 poulets inoculés avec 0.2ml de S20 au niveau de la crête
Groupe 3	8 poulets inoculés avec 0.2ml de S21 au niveau de la crête
Groupe 4	8 poulets inoculés avec 0.2ml de S22 au niveau de la crête
Groupe 5	8 poulets inoculés avec 0.2ml de S23 au niveau de la crête

2. RÉSULTATS

Test PCR

Les échantillons présentait une bande à 578 pb, comme indiqué sur la photo du gel (Figure 1A), correspondant au gène p4b du VVA, caractéristique du grou-

pe des Avipoxvirus.

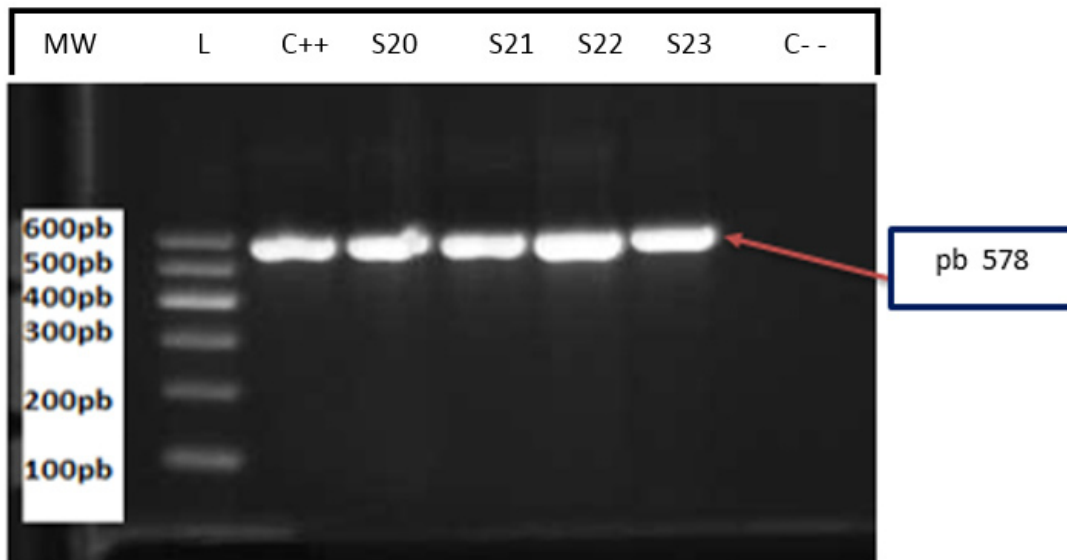


Figure 1 A: Amplification du gène p4b (578 bp). De gauche à droite, MW est le marqueur de poids moléculaire 100 bp. Ligne 1: contrôle positif C+. Lignes

La détection du virus de la réticuloendothéliose se faisait en deux temps : recherche du gène rev(enveloppe) puis du gène 5'itr(partie distale du génome). Cette recherche s'avéra positive pour les échantillons S20 et S21, mais négative pour les échantillons S22 et S23 (Figure 1B).

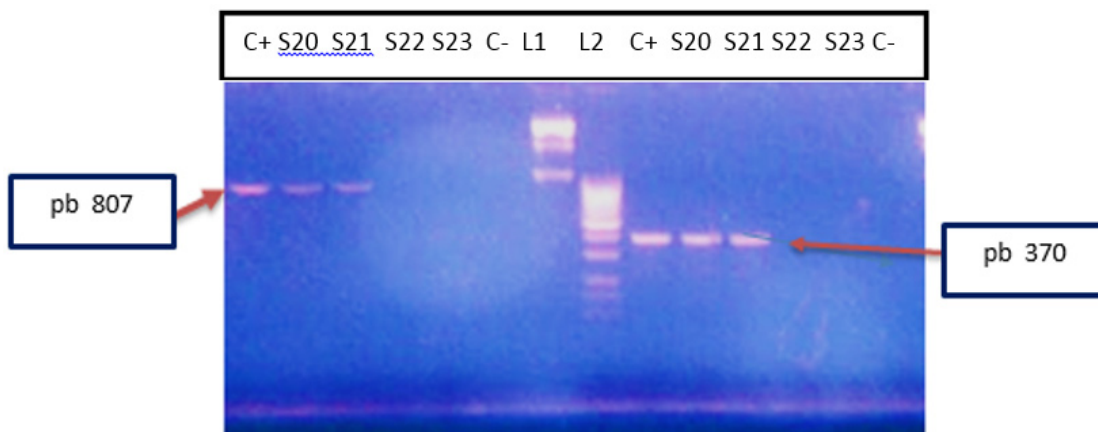


Figure 1 B: Amplification du REV dans les échantillons. Le gène rev se situe à 807bp et le gène 5'itr à 370bp. L1 et L2 représentent respectivement le marqueur de poids moléculaire de 1kb et celui de 100pb. S20 et S21 sont positifs alors que S22 et S23 sont négatifs. C+ et C- représentent respectivement le contrôle positif et le contrôle négatif.

Infection expérimentale

Dans le groupe 1, aucun poulet ne présentait de lésions apparentes. Les sujets des groupes 3, 4 et 5 avaient des pustules nodulaires sur la crête mais sans aucune gravité. Ceux du groupe 2 présentaient non seulement des lésions cutanées prolifératives et nécrosantes, mais également une lymphadénite marquée (renflement de la tête), une prostration ainsi qu'une diarrhée. Au quinzième jour, il apparaissait une paralysie de l'un des membres inférieurs chez plusieurs sujets du groupe 2. De surcroît, il avait été noté un plumage ébouriffé chez tous les sujets de ce groupe ainsi que des nécroses sur le corps. L'état de santé des sujets du groupe 2 s'aggravait de jour en jour, les sujets agonisaient jusqu'à ce que mort s'en suivait. A l'autopsie, on découvrait un foie hypertrophié

et hémorragique avec de pâles nodules à la surface, comparativement au foie d'un sujet du groupe 1, qui apparaissait intact et sain.

3. DISCUSSION

Les profils d'ADN génomiques obtenus ressemblaient à ceux décrits antérieurement par des chercheurs, aussi bien pour l'identification du VVA [9,10], que pour la mise en évidence du virus de la réticuloendothéliose dans le génome du VVA [5,11,12]. Les lésions atypiques apparues lors de cette expérience furent décrites précédemment par Hess et al. [13] ; elles sont reconnues comme étant des signes cliniques pathognomoniques d'une infection par le REV. Pour ce qui est de la pathogénicité de la souche S20 comparativement à la souche S21, elle s'avérait beaucoup plus importante, bien que ces deux souches portaient le gène rev dans leur génome respectif. Ces résultats concordaient avec ceux de Tadese et al.[14] qui évoquait l'existence de deux types de gènes rev. Cette hypothèse était renforcée les travaux de Barbosa [15], qui avait précédemment relaté l'existence de deux types de gène rev : le gène revA(faiblement pathogène), porté par un virus non déficient et le gène revT(virulent), porté par un virus déficient.

En effet, les sujets infectés avec la S21 bien que porteuse de rev, n'avaient montré que des signes de variole classique (pustules cutanées), tout comme les sujets infectés avec les souches S22 et S23 qui en étaient dépourvues. Par conséquent, la seule présence du gène rev dans le génome du virus de la variole ne suffit pas à induire une immunosuppression, il faut que le gène rev soit virulent ou « compétent », pour reprendre les termes de Allison et al. [3]. En effet, cette équipe déduisait que pour qu'il y ait une manifestation oncogénique, il faut que le gène rev intégré soit compétent ; dans le cas contraire, on avait affaire à un gène silencieux non répliquatif qui se comportait comme un virus de variole sans gène rev. Cette variation de virulence entre la S20 et la S21 pourrait également être expliquée par la différence de longueur de la séquence de gène rev intégrée, comme le laissaient augurer les travaux de Joshi et al. [16]. Toutefois, il est aussi important de noter que cette infection des virus de variole, par le REV, n'est ni un événement rare ni systématique, car les souches S22 et S23 en sont dépourvues et cela renforce les observations de Davidson [17].

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Le VVA circule au Sénégal et peut dans certains cas être parasité par le REV pour donner des formes atypiques, graves et persistantes de variole aviaire. En réalité, le virus de la réticuloendothéliose (REV) est un rétrovirus de mammifères qui aurait infecté les oiseaux suite à des manipulations iatrogéniques [18]. De nos jours, la propagation de cette contamination semble être entretenue par l'utilisation de vaccins contaminés, la transmission congénitale de cette infection ainsi que la transmission mécanique par les arthropodes. Le dépistage d'une telle co-infection est indispensable pour le choix des souches vaccinales de variole, d'où la nécessité de recourir à la technique de biologie moléculaire (PCR) pour un diagnostic fiable.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Nayeri Fasaei, B.; Madadgar, O.; Ghalyanchi Langeroodi, A. and Ghafari, M. M. Molecular detection and phylogenetic analysis of Avipoxvirus strains isolated from different bird species. IJVR, 2014 ;15(1-46) 40-44
2. Kabir Md L; Haque Md E; Borty S; Koly M; Md Kamal; Abul Khasruzzaman et al. Isolation

- and Molecular Detection of Fowl Pox and Pigeon Pox Viruses from Recent Outbreak in Bangladesh. Indian J of Life Sciences.2015; Global Academic Society
3. Allison AB, Keel MK, Philips JE, Cartoceti AN, Munk BA, Nemeth NM, et al. Avian oncogenesis induced by lymphoproliferative disease virus: a neglected or emerging retroviral pathogen. *Virology*. 2014; 450(1), 2-12.
 4. Zhao K, He W, Xie S, Song D, Lu H, Pan W, et al. Highly Pathogenic Fowlpox Virus in Cutaneously Infected Chickens in China. *Emerg Infect Dis*. 2014;20(7): 1200-10.
 5. Biswas SK, Jana C, Chand K, Rehman W, Mondal B. Detection of fowlpox virus integrated with reticuloendotheliosis virus sequences from an outbreak in backyard chickens in India. *Vet Ital*. 2011;47 (2), 147-153.
 6. Weli S.C. and Tryland M. Avipoxviruses: infection biology and their use as vaccine vectors. *Virology*. 2011; 8:49
 7. Diallo I.S, Taylor J, Gibson J, Hoed J, De Jong A, Hewison, G et al. Diagnosis of a naturally occurring dual infection of layer chickens with fowlpox virus and gallid herpesvirus 1 (infectious laryngotracheitis virus). *Avian Pathol*. 2010;39(1);25–30.
 8. Masola SN, Mzula A, Kasanga CJ. and Wambura PN. Integration of Reticuloendotheliosis Virus in Most of Tanzanian FowlPox Virus Isolates is not attributed to Imported Commercial FowlPox/Vaccines. *British Biotechnol J*. 2014; 4(6): 659-69
 9. Roy B, Joardar SN, Samanta I, Das PK, Halder A and Nandi S. Molecular characterization of fowl pox virus isolates from backyard poultry. *Adv. Anim. Vet. Sci*. 2013 ;1 (4S) ; 54 – 58.
 10. El-Mahdy SS, Awaad MHH and Soliman YA. Molecular identification of local field isolated fowlpox virus strain from Giza governorate of Egypt. *Vet World*. 2014;7(2): 66-71.
 11. Mzula A, Masola SN, Kasanga CJ, Wambura PN. Existence of variant strains Fowlpox virus integrated with Reticuloendotheliosis virus in its genome in field isolates in Tanzania. *Trop Anim Health Prod*. 2014; 46 (5),711-6
 12. Habiballa, I. I and Khalafalla, A.I. Detection of Reticuloendotheliosis Provirus in the Genome of Fowl Pox Virus Field Isolates in the Sudan using PCR. *Sudan J. Vet. Res*.2017,32: 27-30
 13. Hess, C., Maegdefrau-Pollan, B., Bilic, I., Liebhart, D., Richter, S. and Mitsch, P. Outbreak of cutaneous form of poxvirus on a commercial turkey farm caused by the species fowl pox. *Avian Dis.*, 2011 ; 55(4) ; 714-718.
 14. Tadese, T., Fitzgerald, S., & Reed, W. M. Detection and differentiation of re-emerging fowlpox virus (FWPV) strains carrying integrated reticuloendotheliosis virus (FWPV-REV) by real-time PCR. *Vet Microbiol*, 2008 ; 127(1-2), 39-49.
 15. Barbosa TMC. Pathogenicity, Transmission and Molecular characterization of Reticuloendotheliosis virus strain APC-566. MSc Thesis University of Georgia.2006.
 16. Joshi LR, Bauermann FV, Hain KS, Kutish GF, Armien AG, Lehman CP et al. Detection of Fowlpox virus carrying distinct genome segments of Reticuloendotheliosis virus. *Virus Res*. 2019;260:53-59.
 17. Davidson I.; Shkoda I. and Perk S. Integration of the reticuloendotheliosis virus envelope gene into the poultry fowlpox virus genome is not universal. 2008; *J of General Virology*, 89, 2456–2460.
 18. Niewiadomska A.M; Gifford R.J. The Extraordinary Evolutionary History of the Reticuloendotheliosis Viruses. *PLoS Biol*, 2013 ;11(8): e1001642