

Un nouveau polyomavirus isolé chez l'oie : de l'identification du virus au développement d'un vaccin

A new polyomavirus isolated in goose: from the identification of the virus toward the development of a vaccine

Par Jean-Luc GUERIN , Jacqueline GELFI, Olivier LEON,
Carine CLAVERYS et Michael PAPPALARDO⁽¹⁾
(communication présentée le 18 décembre 2003)

RÉSUMÉ

La Néphrite hémorragique entérite de l'oie (NHEO) constitue une maladie majeure de l'oie. Nous avons récemment isolé son agent et montré qu'il s'agit d'une nouvelle espèce virale du genre Polyomavirus. La biologie de cette infection virale a été étudiée, à l'échelle de l'animal infecté et des populations d'oies, chez les reproducteurs et les oisons destinés au gavage. Un candidat vaccin, inactivé et adjuvé, a été préparé et testé chez les oies reproductrices et les oisons en croissance. Ce programme de recherche devrait permettre à terme le contrôle de l'affection sur le terrain. Il pose aussi la question de l'impact en santé animale, voire en santé publique, des polyomavirus.

Mots-clés : polyomavirus, oie, vaccin, maladie émergente.

SUMMARY

Hemorrhagic nephritis enteritis of geese (HNEG) is a major disease affecting goose. We have isolated its agent and shown that it is a novel member of Polyomavirus genus. The biology of this viral infection has been studied, at the level of both animal and flocks, on breeders and fattening goslings. An inactivated and adjuvanted vaccine has also been prepared and assayed on breeders and goslings. This program should result in the control of the disease on the field. It also addresses the question of the impact of polyomaviruses in animal and public health.

Key words: polyomavirus, goose, vaccine, emerging disease.

(1) UMR INRA-ENVT Interactions Hôtes-Agents Pathogènes, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, 23, chemin des Capelles 31076, TOULOUSE Cedex 3. jl.guerin@envt.fr

• INTRODUCTION

La néphrite hémorragique entérite de l'oie (NHEO) est une infection virale qui affecte la production européenne d'oie depuis plus de 30 ans. Cette entité pathologique fut en effet décrite pour la première fois en 1970 en Hongrie (BERNATH et SZALAI, 1970). Puis, dans les années 1975-77, elle est successivement rapportée en France et en Allemagne (SCHETTLER, 1977). A la suite de cette épidémiologie, une première étude a été consacrée à cette affection en France (VUILLAUME, 1993). Elle a montré qu'un virus en était probablement l'agent étiologique, sans préjuger de l'intervention de cofacteurs d'ordres zootechniques ou nutritionnels (SANS, 1992). Cet agent viral, étroitement spécifique de l'oie, apparaissait manifestement persistant chez les sujets infectés.

Nous avons isolé et identifié l'agent de la NHEO : il s'agit d'un nouveau polyomavirus, le premier virus de cette famille pathogène chez la volaille, et qui diverge des polyomavirus isolés jusqu'à lors (GUERIN *et al.*, 2000). Cette communication fait état de la découverte de ce virus et des avancées récentes qui en découlent.

• LA NHEO : DESCRIPTION CLINIQUE

Cette affection se caractérise par un taux de mortalité variant de 20 à 80 % selon les lots atteints, chez des sujets âgés de 4 à 12 semaines. Les animaux s'affaiblissent brutalement, s'isolent dans le bâtiment ou sur le parcours et meurent en quelques heures. L'autopsie révèle régulièrement des lésions caractéristiques (figures 1 et 2) : un oedème et une ascite gélatineuse, une néphrite et, de manière inconstante, une entérite muco-hémorragique (SCHETTLER, 1980 ; VUILLAUME, 1982 ; GUERIN *et al.*, 1999 ; GUERIN, 2003). 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 (GUERIN, 2003). Cette déplétion est certainement associée à une immunodépression chez le sujet infecté, même de manière inapparente. Des foyers hémorragiques sont observés dans de nombreux tissus, en particulier dans les formes suraiguës.

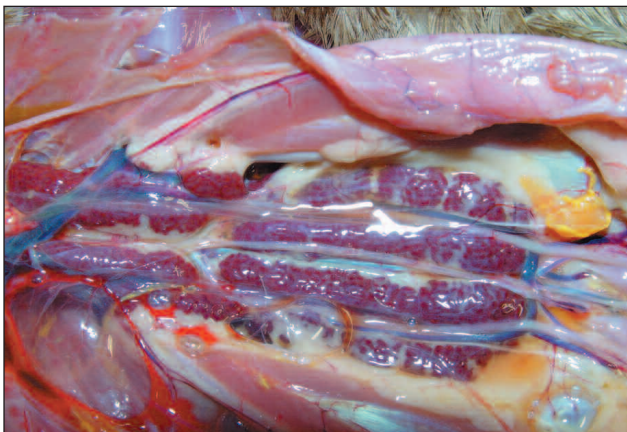


Figure 1 : Aspect macroscopique des reins d'un oison mort d'une forme aiguë de NHEO : noter l'hypertrophie et la congestion de tous les lobes rénaux.

Aucune inclusion nucléaire basophile, élément histopathologique classiquement associé aux infections à polyomavirus, n'a jamais été observée dans les cellules infectées par le virus de la NHEO. Seules quelques modifications cellulaires et nucléaires non spécifiques sont notées, comme une caryomégalie, une margination de la chromatine ou une pycnose nucléaire.

• L'IDENTIFICATION DU VIRUS DE LA NHEO

L'identification de ce virus s'est opérée en trois grandes étapes, visant d'abord à le purifier à partir de matériel biologique issu de cas spontanés, puis à tenter l'adaptation à un système de culture cellulaire et enfin, caractériser son génome.

Purification et isolement du virus

A partir du foie et de la rate d'oisons morts expérimentalement de NHEO, un protocole de concentration et purification a été mis en oeuvre : après broyage en tampon et extraction des lipides au fréon, la phase aqueuse a été concentrée par ultracentrifugation sur un coussin de saccharose à 30 %. Après ultracentrifugation isopycnique en gradient de saccharose, ce protocole de purification a produit une bande visible, correspondant à une densité de flottaison de 1,20g/cm³. L'examen du matériel purifié au microscope électronique après coloration négative par l'acide phosphotungstique nous a permis d'observer des particules virales évoquant un papovavirus, d'un diamètre de 45 à 50 nm.



Figure 2 : Articulation tibiométatarsienne d'un oison atteint de NHEO : noter les dépôts d'urates, associés cliniquement à des troubles locomoteurs.

L'inoculation des fractions purifiées à partir de tissus infectés à des oisons conventionnels d'un jour a entraîné la mortalité de tous les animaux. Les fractions purifiées à partir des tissus infectés ou de cultures cellulaires conservent un pouvoir infectieux après traitement à 55°C pendant une heure. Cette résistance à la chaleur est incompatible avec la présence d'une enveloppe à la surface du virus.

Adaptation du virus à la culture cellulaire

Le virus a été adapté à la culture dans des cellules épithéliales de reins d'oisons, préparées à partir d'un oison d'un jour conventionnel. Dès le premier passage, les cellules infectées ont présenté entre 5 et 10 jours après l'infection un effet cytopathogène caractérisé par un bourgeonnement de la membrane plasmique, conduisant au décollement de la couche cellulaire. Les fibroblastes semblent réfractaires puisque après 6 passages sur ces cultures, nous ne sommes pas parvenus à mettre en évidence l'agent infectieux. L'examen en immunofluorescence des cellules rénales infectées a montré la présence abondante d'antigènes viraux dans leur noyau, alors que les cellules témoins non-infectées ne présentaient aucune fluorescence. L'observation en microscopie électronique a été réalisée 5 jours après l'infection sur des coupes ultrafines de cellules incluses en résine : on note la présence de nombreuses particules virales dans le noyau, alors que des vacuoles sont observées dans le cytoplasme. Ces observations indiquent une réplication intranucléaire, ce qui est compatible avec le cycle lytique de certains virus à ADN, comme les polyomavirus.

Analyse moléculaire

L'ADN extrait des fractions purifiées a été soumis à une amplification par PCR. Notre approche a consisté à amplifier de manière aléatoire des fragments d'acide nucléique présent dans les fractions purifiées. A partir de

ces premiers produits, nous avons assemblé une première séquence de 1175 pb. La comparaison de cette séquence avec celles des banques de données informatiques a montré une homologie avec le gène codant pour la protéine VP1 de plusieurs polyomavirus. Des amorces spécifiques de ce fragment (VP1F : 5'-GAGGTTGTTGGAGTCAC-CACAATG-3' et VP1R : 5'-ACAACCCTGCAATC-CAAGGGTTC-3') ont ensuite été conçues et utilisées pour analyser différents prélèvements du terrain ainsi que les extraits de culture cellulaire. Ces travaux ont confirmé la corrélation stricte entre le pouvoir infectieux du virus et la présence de la séquence de polyomavirus. Aucune amplification n'a pu être obtenue avec des prélèvements d'animaux non-infectés. La comparaison de la séquence de la protéine VP1 du virus de la NHEO et de celle de 8 polyomavirus a révélé la présence de 50 à 59 % d'acides aminés identiques et 63 à 72 % d'acides aminés similaires (Tableau 1). A partir de cette séquence connue, des amplifications par PCR ont été réalisées à l'aide d'amorces dégénérées, correspondant à des séquences consensus pour les autres polyomavirus : ainsi, de proche en proche, le génome complet a été cloné puis séquencé : la taille du génome viral est de 5256 pb, ce qui le rapproche des polyomavirus de mammifères (Tableau 1). L'arbre phylogénétique de ces virus, construit à l'aide des logiciels NEIGHBOR et DNAPars, a d'ailleurs confirmé l'étroite relation génétique entre le virus NHEO et les autres membres du genre *Polyomavirus* (Figure 3). L'ensemble de ces résultats montrent que l'agent de la NHEO est un nouveau polyomavirus. Nous proposons pour ce virus la dénomination de *Goose hemorrhagic polyomavirus* (GHPV). La technique de PCR présentée ici constitue un premier outil diagnostique susceptible de confirmer une suspicion de cas clinique ou de portage asymptomatique. Le GHPV a ensuite été détecté dans des échantillons correspondant aux premiers cas décrits en Hongrie (BERNATH *et al.*, 2001) et provenant de cas décrits en Allemagne (MIKSCH *et al.*, 2002).

Virus	Espèce(s) hôte(s)	% Identité (VP1)	% Similarité (VP1)	Taille du génome (pb)
GHPV	Oie	100	100	5256
BFDV	Psittacidés (et autres espèces aviaires)	56	71	4980
JC	Homme	54	70	5130
BK	Homme	53	73	5153
SV 40	Singe Rhésus	57	72	5243
LPV	Singe vert	55	69	5270
Mouse Pol.	Souris	52	69	5297

Tableau 1 : Analyse génétique comparée du GHPV et de 6 polyomavirus. Comparaison globale de la séquence en aminoacides de la VP1: pourcentage d'acides aminés identiques (% identité) ou présentant les mêmes caractéristiques physico-chimiques (% similarité). La taille totale du génome du GHPV s'apparente à celle des virus de mammifères, contrairement au BFDV.

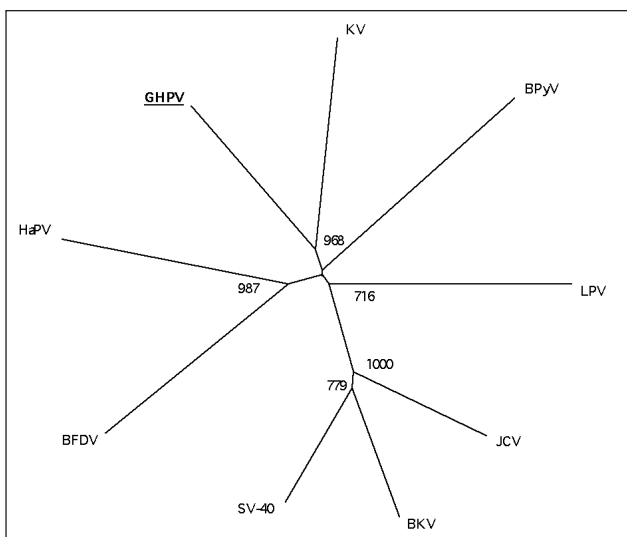


Figure 3 : Arbre phylogénétique de la famille des Polyomaviridae, basé sur la séquence complète de la VP1 du GHPV et de 8 autres membres de la famille : Budgerigar fledgling disease virus (BFDV) ; Hamster polyomavirus (HaPV) ; polyomavirus murin K (KV) ; Bovine polyomavirus (BPyV) ; Lymphotropic polyomavirus (LPV) ; virus humains JC et KV (JCV) ; BKV) et Simian virus 40 (SV40). Noter que le GHPV correspond à une entité génétique indépendante des autres polyomavirus et en particulier du BFDV.

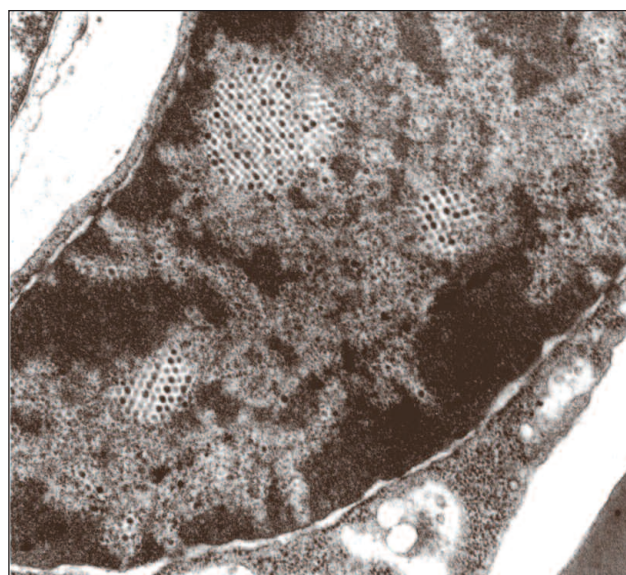


Figure 4 : Aspect en microscopie électronique d'une cellule endothéliale de follicule plumeux d'oison infecté expérimentalement par le GHPV. Le noyau renferme de nombreux virions organisés en réseaux cristalloïdes. Noter également la margination de la chromatine nucléaire.

• COMPRENDRE LA BIOLOGIE DU POLYOMAVIRUS DE L'OIE

Après l'identification du GHPV, notre travail a porté sur la compréhension de la biologie du virus en suivant deux axes de recherche : (i) une étude morphologique réalisée sur des sujets infectés naturellement ou expérimentalement pour identifier les tissus-cibles et les conséquences lésionnelles de l'infection et (ii) l'étude de la distribution du virus dans les élevages ou parmi les oies migratrices.

Pathogénie de la maladie

Une analyse morphologique nous a permis de préciser les lésions histologiques et cytologiques et de déterminer les sites de réplication virale au cours d'une infection expérimentale. Deux lots d'oisons, infectés ou témoins, ont été séquentiellement sacrifiés, autopsiés et prélevés : une analyse histopathologique systématique a été réalisée et quelques tissus ont été examinés en microscopie électronique (Figure 4) (collaboration avec le Centre de Microscopie électronique appliquée, Faculté de Médecine, UPS). Une recherche du virus par PCR a également été entreprise (LACROUX *et al.*, 2004). Cette étude devrait être complétée par une détection du génome viral par hybridation *in situ*. Les résultats montrent que l'infection par le GHPV provoque un tableau lésionnel similaire à celui qui est associé au BFDV (*Budgerigar fledgling disease virus*), agent de la maladie chez les psittacidés, avec quelques variantes, en particulier l'absence d'inclusions intranucléaires. La déplétion lymphocytaire au niveau de la bourse de Fabricius est régulièrement spectaculaire, et peut expliquer pour partie la pathogénie de la

maladie. Le virus de la NHEO doit donc être considéré non seulement comme l'agent d'une maladie aiguë, mais aussi comme un virus immunodépresseur, susceptible de faire le lit d'autres affections.

Etude de la prévalence d'infection

Trois démarches ont été entreprises pour mieux comprendre la distribution et la circulation du virus dans les populations d'oies domestiques et sauvages :

- une évaluation du portage du virus dans les troupeaux de reproducteurs : des écouvillons cloacaux ont été réalisés sur 21 troupeaux de reproducteurs : 14 d'entre eux sont porteurs du virus (c'est-à-dire comptent au moins un sujet positif dans l'échantillon), soit une prévalence de troupeau de 66,7 %, sachant que dans un troupeau « porteur », le pourcentage d'individus infectés varie considérablement, de 7 à 90 % (LEON, 2002). La question de la transmission verticale du virus se pose ; cependant, à ce jour nous n'avons pas pu détecter de séquence virale chez les oisons d'un jour ;
- une enquête sur les oisons gavés à l'abattoir, pour disposer d'une « photographie » des animaux à la fin de leur vie économique : sur la base d'un plan d'échantillonnage, des prélèvements sanguins ont été effectués dans des lots d'oisons pour détecter le virus par PCR. Sur 30 lots prélevés à l'abattoir, 10 se sont révélés positifs (c'est-à-dire comprenant au moins un sujet positif sur les 15 analysés par lot) : le pourcentage de lots infectés est donc estimé à 46,7 ± 17,8 % (intervalle de confiance à 95 %) ;

- une démarche a été également engagée pour évaluer le portage viral chez les oies sauvages migratrices : des contacts ont été établis avec les organisations de chasse qui ont collecté, centralisé et nous ont fait parvenir des tissus de différentes espèces d'oies tuées au cours de leur migration : ainsi des analyses PCR ont été effectuées sur les 3 espèces chassées qui passent par la France lors de leur voyage post-nuptial : oie cendrée (*Anser anser*), oie des moissons (*Anser fabalis*) et oie rieuse (*Anser albifrons*). Au cours de la saison 2001-2002, une soixantaine d'échantillons en provenance de différents sites (Vendée, Somme, Aquitaine) ont été analysés et deux d'entre eux, provenant d'oies cendrées, se sont révélés positifs en PCR (LEON, 2002).

Le portage à long terme est en tout cas clairement montré chez l'oie infectée. Ceci est en accord avec la biologie des autres polyomavirus (RITCHIE, 1991; SHAH, 1996) et avec les observations de terrain concernant la NHEO (SCHETTLER, 1977; SANS, 1992 ; KISARY, 1993). La détection de virus chez des oies sauvages migratrices devra faire l'objet de travaux de caractérisation virale avant de tirer des conclusions quant aux interactions épidémiologiques avec les oies d'élevage et à la spécificité d'espèce du GHPV.

• VERS UNE PRÉVENTION VACCINALE

La maîtrise de la NHEO dans les élevages doit faire appel à une stratégie fondée sur la connaissance du statut virologique des animaux, le respect de règles techniques et hygiéniques. Elle nécessite à terme le recours à la vaccination des reproducteurs et éventuellement, de l'oison à gaver. La mise au point d'un vaccin de première génération a donc constitué un objectif prioritaire.

La vaccination des reproducteurs vise à transmettre à l'oison des anticorps d'origine maternelle susceptibles de le protéger pendant la phase de démarrage, pendant laquelle les oisons sont le plus sensibles à l'infection. Une approche vaccinale a donc été envisagée, sur le modèle du vaccin contre le polyomavirus des psittacidés (RITCHIE *et al.*, 1996).

Un vaccin inactivé et adjuvé a été préparé à partir d'extraits de cellules de rein d'oison infectées. Après culture sur le système cellulaire décrit ci-avant, le surnageant est clarifié et le virus est titré avant inactivation par une technique de PCR quantitative. Des essais préliminaires nous ont amenés à fixer à 10^{10} « équivalent génomes » la quantité de virus correspondant à une dose vaccinale. Le virus est ensuite inactivé par incubation avec 0,3 % final de β -propiolactone, selon un protocole éprouvé pour le vaccin contre le BFDV chez les psittacidés (RITCHIE *et al.*, 1996). Dans une première approche, un polymère acrylique, le Carbopol™, a été employé de préférence aux émulsions classiquement utilisées chez la poule, pour limiter les réactions post-vaccinales. Ce vaccin a été expérimenté à raison de 2 injections à 3-4 semaines d'intervalle sur des lots d'oies reproductrices (6 et 2 semaines avant l'entrée en ponte). Une séroconversion, révélée par titrage des anticorps par une technique

ELISA, est observée dès la première injection et les titres en anticorps se maintiennent au moins jusqu'à la fin de la période de ponte de l'oie reproductrice. Les anticorps d'origine maternelle (AOM) présentent un titre moyen élevé chez les oisons de 1 jour issus de mères vaccinées, confirmant l'efficacité du passage des anticorps de l'oie au jeune via le vitellus. Les oisons issus d'oies vaccinées présentent une protection significative contre une épreuve virulente pratiquée à l'âge de un jour. Aucune réaction post-vaccinale localisée ou générale n'a été observée à l'occasion des différents essais (PAPPALARDO, 2002).

La vaccination des oisons en croissance a également fait l'objet d'essais afin d'évaluer dans quelle mesure elle permet de relayer l'immunité passive et d'assurer une couverture vaccinale jusqu'à la fin de la vie économique des animaux. Après une, voire deux injections sur les oisons en croissance (à 2 et éventuellement, 6 semaines d'âge), les titres en anticorps se maintiennent au moins jusqu'à l'abattage des oisons gavés. La pertinence de la vaccination de l'oison à gaver devra être évaluée après la mise en place de la vaccination chez les reproductrices : on pourra alors apprécier l'effet de l'immunité maternelle sur l'incidence de la NHEO sur le terrain.

• LES POLYOMAVIRUS AVIAIRES : QUEL IMPACT SANITAIRE ?

L'analyse génétique de l'agent de la NHEO a permis de le classer parmi les 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).

Les polyomavirus sont largement répandus 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). Des virus variants ont été isolés chez d'autres psittacidés et des oiseaux sauvages, comme les passereaux et les falconidés (RITCHIE, 1991). À 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). 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 de 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. 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.

Les polyomavirus de mammifères sont connus pour leur pouvoir oncogène : le virus SV40 ou le polyomavirus murin ont un pouvoir transformant avéré sur cellules humaines ou chez le souriceau (SHAH, 1996). Le SV40 a par ailleurs fait l'objet d'un nombre considérable de travaux destinés à évaluer son rôle dans la promotion de tumeurs chez les sujets vaccinés contre la poliomyélite avec le vaccin vivant Sabin et massivement exposés à cette occasion à la contamination par le SV40. Si le pouvoir oncogène du GHPV n'a pas été évalué à ce jour, il semble

exclu pour le BFDV (RITCHIE, 1991). Ce résultat est conforté par les différences majeures observées au niveau de la structure de l'Antigène T entre les virus aviaires et le SV40 ou le polyomavirus murin.

Au-delà de ses prolongements finalisés sur la maîtrise d'une maladie de l'oie, la mise en évidence du GHPV remet en question l'unité des polyomavirus aviaires au sein de la famille des *Polyomaviridae*. L'analyse moléculaire comparée de ces virus devrait apporter des informations précieuses pour comprendre leur biologie et leur pouvoir pathogène. L'impact sanitaire des polyomavirus est sans doute totalement mésestimé et devrait faire l'objet d'une évaluation sérieuse, qui ne saurait se limiter aux oiseaux.

REMERCIEMENTS

Ce programme de recherche bénéficie du soutien financier des Conseils Régionaux de Midi-Pyrénées et d'Aquitaine, du CIFOG (Comité interprofessionnel des Palmipèdes à Foie gras) et de l'OFIVAL (Office Interprofessionnel des Viandes, de l'Élevage et de l'Aviculture). Nous remercions Jean-Luc PINGRET, Bruno PAYRE, Mylène LEMAIRE et Caroline LACROUX pour leur contribution au projet.

BIBLIOGRAPHIE

- BERNATH S, HORVATH E, KOVACS A, NAGY E, DOBOS-KOVACS M, SZALAI F, FARSANG A (2001) Etiology and epidemiological significance of the hemorrhagic nephritis and enteritis of geese. *Magyar Allatorvosok Lapja*, **123**, 522-525.
- BERNATH S, SZALAI F (1970) Investigations for clearing the etiology of the disease appeared among goslings in 1969. *Magyar Allatorvosok Lapja*, **25**, 531-536.
- BOZEMAN LH, DAVIS RB, GAUDRY D, LUKERT PD, FLETCHER OJ, DYKSTRA MJ (1981) Characterization of a papovavirus isolated from fledgling budgerigars. *Avian Dis.*, **25**, 972-980.
- CLAVERYS C (2002) *Mise au point et validation d'un vaccin inactivé contre la Néphrite Hémorragique Entérite de l'Oie (NHEO)*. Thèse Med. Vet., Toulouse; n°4197, 60 pages.
- DUBOIS L (2002) *Isolement et identification du polyomavirus agent de la néphrite hémorragique entérite de l'oie (NHEO)*. Thèse Med. Vet., Toulouse; n°4030, 44 pages..
- GUERIN, J-L (2003) Hemorrhagic Nephritis Enteritis of Geese. In: Saif YM, (Ed), *Diseases of Poultry*, Ames: Iowa State University Press. pp. 363-367.
- GUERIN J-L, GELFI J, DUBOIS L, VUILLAUME A, BOUCRAUT-BARALON C, PINGRET J-L (2000) A novel polyomavirus (Goose hemorrhagic polyomavirus) is the agent of Hemorrhagic nephritis enteritis of geese. *J. Virol.*, **74**, 4523-4529.
- GUERIN J-L, PINGRET J-L, DUBOIS L, VUILLAUME A, BOUCRAUT-BARALON C, SANS P (1999) La Néphrite Hémorragique-Entérite de l'Oison (N.H.E.O.). *Bulletin des GTV* **2**, 9-10.
- KISARY J (1993) Haemorrhagic nephritis and enteritis of geese. In: McFERRAN JB, McNULTY MS editors. *Virus infections of birds*. London: Elsevier, pp. 513-514.
- LACROUX C, ANDREOLETTI O, PAYRE B, PINGRET J-L, DISSAIS A, GUERIN J-L (2004) Pathology of spontaneous and experimental infections by *Goose haemorrhagic polyomavirus*. *Avian Pathol.*, sous presse.
- LEON O (2002) *Epidémiologie descriptive de la Néphrite Hémorragique Entérite de l'Oie (NHEO)*. Thèse Med. Vet., Toulouse; n°4203, 94 pages.
- MIKSCH K, GROSSMANN E, KÖHLER K, JOHNE R (2002) Detection of Goose haemorrhagic polyomavirus (GHPV) in flocks with haemorrhagic nephritis and enteritis of geese in Southern Germany. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.*, **115**, 390-394.
- PAPPALARDO M (2002) *Évaluation de l'innocuité, immunogénicité et efficacité d'un vaccin inactivé contre la Néphrite Hémorragique Entérite de l'Oie (NHEO)*. Thèse Med.Vet., Toulouse; n°4196, 57 pages.
- PHALEN DN, WILSON VG, GASKIN JM, DERR JN, GRAHAM DL (1999) Genetic diversity in twenty variants of the avian polyomavirus. *Avian Dis.*, **43**, 207-218.
- RITCHIE BW (1991) Avian polyomavirus: an overview. *J. Am. Avian Vet.*, **3**, 147-153.

- RITCHIE BW, NIAGRO FD, LATIMER KS, PRITCHARD N, CAMPAGNOLI RP, LUKERT PD (1996) An inactivated avian polyomavirus vaccine is safe and immunogenic in various Psittaciformes. *Vaccine*, **14**, 1103-1107.
- SANS P (1992) *Contribution à l'étude de la maladie des jeunes oies*. Thèse Med.Vet., Toulouse; n°4110, 60 pages.
- SCHETTLER, CH (1977) Détection en France de la néphrite hémorragique et entérite de l'oie. *Rec. Med. Vet.*, **153**, 353-355.
- SCHETTLER, CH (1980) Clinical aspect and pathology of hemorrhagic nephritis and enteritis in geese. *Tierarztl. Prax.*, **8**, 313-320.
- SHAH KV (1996) Polyomaviruses. In: *Fields BN et al. editors, Fields Virology*, 3rd ed. Philadelphia: Lippincott-Ravett, pp. 2027-2043.
- VUILLAUME A (1993) La maladie des jeunes oies destinées au gavage : le point sur l'avancement des travaux de recherche. In : *Premières journées de la recherche sur les Palmipèdes à foie gras*. Bordeaux. 141-150.