

EMERGENCE DE NOUVEAUX VARIANTS DU VIRUS GUMBORO DANS L'OUEST DE LA FRANCE

Ledoux Anne-Laure, Jaunet Hervé

Fort Dodge France, BP 440, 37204 Tours cedex 4

RESUME

Dans le cadre d'un service de soutien au diagnostic de la maladie de Gumboro, mis à la disposition des vétérinaires avicoles français par Fort Dodge Santé Animale, un nombre croissant de soumission de prélèvements a été obtenu ces deux dernières années. Le premier motif de soumission renseigné par les vétérinaires (chute de performances) correspond bien à l'objectif de ce service, même s'il est regrettable que l'augmentation de prélèvements soumis pour analyses s'accompagne d'une fréquence accrue de l'absence de commémoratifs renseignés. Il reste que ce service a permis d'identifier un IBDV répondant aux différents de critères permettant de le considérer comme un variant. Ce variant était présent dans 3 lots soumis à analyses en 2007 (pour 31 élevages) et dans 14 autres au cours des 8 premiers mois de 2008 (pour 84 élevages).

ABSTRACT

Thanks to the Gumboro disease diagnostic service, made available to French poultry veterinarians by Fort Dodge Santé Animale, a growing number of samples have been submitted in the past two years. The main reason for submission, as indicated by the veterinarians (i.e. a drop in performance) corresponds well to the objective of this service. However, it is to be regretted that the number of samples without a case history increases in parallel with the number of submissions. Nevertheless, the service has allowed to identify an IBV virus which fulfills the criteria allowing to consider it as a variant. This variant was present in 3 batches submitted for analysis in 2007 and in a further 14 during the first 8 months of 2008.

INTRODUCTION

La maladie de Gumboro (ou bursite infectieuse) est une maladie de la liste de l'Organisation Mondiale de la Santé Animale (OIE, http://www.oie.int/eng/maladies/en_alpha.htm?e1d7). En France, elle n'est pas une maladie réputée contagieuse, ni une maladie à déclaration obligatoire (Anonyme, 2008). La maladie se caractérise par une immunosuppression chez le jeune oiseau, causée par l'infection par le virus de la bursite infectieuse (IBDV, pour *Infectious Bursal Disease Virus*). Deux sérotypes de l'IBDV sont connus, mais seul le sérotype 1 provoque des signes cliniques chez le poulet (*Gallus gallus*). Au cours des années 80, des souches d'IBDV de sérotype 1 mais présentant des différences antigéniques par rapport aux souches connues jusque-là ont été mises en évidence aux Etats-Unis. Elles échappent à la protection passive induite par les vaccins inactivés classiques administrés aux reproducteurs (Lukert & Saif, 1997). Ces souches étaient capables d'infecter précocement leur descendance. Ces nouvelles souches ont été qualifiées de "variants". Bien qu'aucune définition officielle n'ait été actée pour cette appellation, il est communément admis qu'un variant de l'IBDV est un isolat de sérotype 1 présentant des différences antigéniques vis-à-vis des souches classiques d'IBDV et que ces différences sont appuyées par une modification de la séquence génétique (hors mutations silencieuses) de la partie variable de la protéine virale 2 (VP2), en particulier au pic hydrophile majeur B de cette protéine.

À la suite de la description de variants en Amérique du Nord, puis en Australie (Sapats & Ignjatovic, 2000), la présence d'isolats d'IBDV génétiquement et antigéniquement distincts des souches classiques a été fortement suspectée en France et en Espagne (Jackwood, 2006), ainsi que dans d'autres pays. Du fait des différences de séquence correspondant à des sites antigéniques majeurs, ces souches ont été considérées comme variantes. En 2007 et 2008, un nombre croissant de prélèvements issus d'élevages français ont été soumis pour analyses diagnostiques de maladie de Gumboro au service mis en place par Fort Dodge Santé Animale. Le présent article en présente la synthèse et signale l'identification d'un nombre croissant de situations de terrain où la présence de virus variant peut être incriminée.

MATÉRIEL ET MÉTHODE

Origine des prélèvements

Dans le cadre d'un service de soutien au diagnostic de la maladie de Gumboro en élevage mis en place en 2002 par le laboratoire Fort Dodge Santé

Animale, les vétérinaires avicoles peuvent réaliser, lors de suspicion de cette maladie dans un poulailler de chair, des prélèvements destinés à analyses complémentaires. Les motifs cliniques pour lesquels de tels prélèvements sont soumis à ce service sont : chute de performances dans le lot prélevé et/ou le(s) lot(s) précédent(s), suspicion clinique de maladie de Gumboro et/ou observation de lésions macroscopiques des bourses de Fabricius à l'autopsie. Un formulaire standard (fiche de renseignements) a été mis au point dans ce cadre (il est disponible sur demande auprès des auteurs).

Élevages

Les élevages concernés sont des élevages de poulets de chair, conventionnels ou labels, sans limitation géographique (France métropolitaine). Lorsque plusieurs poulaillers sont prélevés, une fiche est remplie par poulailler, et le nom du bâtiment (par exemple P1, P2, etc.) est porté sur la fiche.

Prélèvements

Ces prélèvements (bourses de Fabricius) sont à réaliser par le vétérinaire (ou le technicien avicole sous sa surveillance), selon des modalités prédéfinies : trois âges différents sont prélevés, idéalement à une semaine d'écart à partir de J21, et sur cinq oiseaux par classe d'âge. Les organes prélevés sont sectionnés, une moitié étant congelée et l'autre placée dans un fixateur (formol). Les prélèvements sont adressés à Fort Dodge Santé Animale sous régime du froid, où ils sont codés (un numéro de code par fiche). Ces numéros sont attribués par le siège Nord-Américain de Fort Dodge, par ordre d'arrivée des demandes de codage de l'ensemble des pays européens. Ainsi, tous les codes de prélèvements originaires d'élevages français ne se présentent pas sous forme d'une suite arithmétique (numérotation discontinue). Ces prélèvements sont orientés vers deux types d'analyses.

- Les prélèvements congelés sont destinés à l'analyse moléculaire (RT-PCR et séquençage) ;
- Les prélèvements fixés dans le formol sont destinés à l'analyse histologique spécifiquement développée par Fort Dodge Animal Health.

Les envois des prélèvements aux laboratoires effectuant ces analyses sont réalisés par Fort Dodge Santé Animale France. Toutefois, certains prélèvements n'ont pas été envoyés pour analyse moléculaire. Ce sont les prélèvements qui nous sont parvenus décongelés, voire autolysés, ainsi que les prélèvements pour lesquels la technique d'histologie n'a pas mis en évidence de lymphodépilation. Pour l'année 2008, du fait du grand nombre de prélèvements soumis (voir "résultats"), l'analyse moléculaire a pu être réalisée

seule sur les prélèvements, du fait de délais importants pour l'analyse histologique.

Histologie

Les prélèvements fixés dans le formol sont adressés au laboratoire d'analyses des services de santé animale (GD) de Deventer (Pays-Bas), où les lames histologiques sont préparées (coloration Hémalum-Éosine-Safran). Elles sont ensuite expédiées au laboratoire d'analyses de Fort Dodge Animal Health aux États-Unis, où elles sont lues automatiquement par ordinateur, selon un programme automatisé permettant d'évaluer l'importance de l'éventuelle déplétion lymphocytaire dans la bourse (Stewart-Brown, 1990). Cette analyse fournit un résultat semi-quantitatif : si la note est >35 %, la bourse examinée est dénuée de lésions ; si la note est comprise entre 26 et 35 %, la bourse examinée présente des lésions tissulaires mineures. Lorsque la note est <26 %, la bourse examinée présente une déplétion tissulaire importante.

Analyses moléculaires

L'extraction de l'ARN génomique et la RT-PCR ont également été réalisées au laboratoire du GD de Deventer (Pays-Bas), selon une méthodologie décrite par ailleurs (Jackwood, 2006). Les amorces utilisées ciblent une portion du gène de la protéine virale VP2, produisant un amplicon de 539 paires de bases correspondant aux positions 710 à 1248 de la séquence nucléotidique homologue. Le séquençage des amplicons a également été réalisé par le même laboratoire, et l'alignement des séquences obtenues a été réalisé à l'aide du logiciel Bioedit.

RÉSULTATS

Élevages et contexte clinique

Pour l'année 2007, sur 37 fiches d'élevages retournées avec les prélèvements, correspondant à 31 élevages, 27 (soit 73 %) portaient mention de commémoratifs. Ces derniers étaient variés, pouvant ne comporter mention que d'un signe (par exemple : mortalité en pics) ou de nombreuses observations. Ces observations sont regroupées dans le tableau 1 ; la mention la plus fréquente était la baisse des performances (ou de croissance, ou l'hétérogénéité). La baisse des performances dans un ou des lot(s) précédent(s) est mentionnée 6 fois, mais 5 de ces signalements ont été réalisés par le même praticien. L'origine régionale des prélèvements était majoritairement des Pays-de-la-Loire ($n=16$), devant la Bretagne ($n=6$), le Nord ($n=4$), le Sud-Ouest ($n=2$), le Centre et l'Est ($n=1$). Une fiche ne renseignait pas le département d'origine de l'élevage.

Pour les huit premiers mois de l'année 2008, 100 fiches d'élevages ont été retournées avec les prélèvements, correspondant à 84 élevages, et avaient obtenu des résultats d'analyses (à la date du 10/09/2008). Cinquante-neuf fiches ne comprenaient pas de commémoratifs renseignés (soit 41 % de commémoratifs cliniques présents). À noter que la vaccination Gumboro n'était pas renseignée ou était mentionnée comme inexistante sur 23 fiches. Les observations cliniques sont regroupées dans le tableau 1 ; la mention la plus fréquente restait la baisse des performances. La baisse des performances dans un ou des lot(s) précédent(s) est mentionnée presque aussi souvent, et par de nombreux praticiens. Le signalement de coccidiose (y compris sur un lot vacciné) apparaît pour deux élevages. De même, le motif de « contrôle » de la qualité de vaccination est mentionné comme seul commémoratif par un praticien (3 élevages). Le département d'implantation des élevages n'est pas renseigné avec suffisamment de constance pour permettre d'en présenter les tendances.

Analyses moléculaires

Pour l'année 2007, 13 prélèvements n'ont pas été soumis à RT-PCR (soit 35,1 %), mais la majorité d'entre eux a été soumise à analyse histologique (3 ont présenté des lésions compatibles avec l'infection par un virus vaccinal). Sur les 24 prélèvements soumis à RT-PCR, 22 ont été trouvés positifs. Les deux prélèvements trouvés négatifs provenaient de deux élevages différents (Bretagne et Pays-de-la-Loire) dont les commémoratifs mentionnaient retard de croissance et lot hétérogène pour l'un, retard de croissance sur les lots antérieurs pour l'autre. Un autre bâtiment de ce dernier élevage a fourni un résultat positif. Sur les 22 prélèvements trouvés positifs, 7 étaient faiblement positifs (ne permettant pas le séquençage) et 15 ont permis de réaliser le séquençage de l'amplicon. Pour 5 des prélèvements dont le séquençage a été possible, il indiquait 100 % d'homologie avec la souche vaccinale mentionnée dans les commémoratifs (trois fois pour la souche 228E, une fois la souche Bursine 2 et une fois pour la souche D78). Dans deux autres cas (même élevage), la séquence était compatible avec une souche vaccinale, mais le vaccin n'était pas renseigné dans les commémoratifs. Dans 4 autres cas (3 élevages), le séquençage pointait vers une souche apparentée au groupe moléculaire 6 (souches hypervirulentes). Deux de ces élevages avaient pour commémoratifs : "Gumboro clinique". Dans un autre élevage, le séquençage indiquait « 100 % d'homologie avec la souche hypervirulente DV86 » (commémoratifs non renseignés). Enfin, dans trois cas, le séquençage a révélé une séquence originale au sein de la région de la VP2 correspondant au pic

hydrophile majeur B (voir la figure 1). Ces séquences ont un acide aspartique (D) en position 318 (contre une glycine dans la séquence consensuelle classique et chez les souches vaccinales) et un acide glutamique (E) en position 323 (contre un acide aspartique dans la séquence consensuelle et les souches vaccinales). Il s'agit de trois élevages localisés dans des départements différents des Pays-de-la-Loire. Les commémoratifs n'étaient pas renseignés pour l'un, mentionnaient un retard de croissance pour l'autre et un lot hétérogène pour le troisième. Deux de ces bandes avaient été vaccinées à J15 avec un vaccin "chaud", la troisième avait été vaccinée (2 administrations, âges non précisés) avec un vaccin "intermédiaire".

Pour l'année 2008, 17 prélèvements n'ont pas été soumis à RT-PCR (soit 17 %), mais tous ont été analysés en histologie (tous présentaient une absence de lésions, dont deux des trois élevages ayant soumis des prélèvements pour « contrôle »). Sur les 83 prélèvements soumis à RT-PCR, 24 ont été trouvés négatifs (dont 18 n'ayant pas de commémoratifs cliniques renseignés, soit 75 %). Sur les 59 prélèvements trouvés positifs, 7 l'étaient faiblement (ne permettant pas le séquençage), mais l'analyse histologique a été jugée compatible avec des lésions occasionnées par une souche vaccinale. Sur les 52 résultats positifs ayant permis le séquençage, 35 ont fourni un résultat compatible avec une souche vaccinale. Pour deux élevages, les séquences ont été jugées très apparentées à la souche DV86. Enfin, 14 séquences (issues de 10 élevages) ont été trouvées porteuses des mêmes mutations originales que celles identifiées pour 3 prélèvements en 2007 (D en 318 et E en 323, voir figure 1). Le statut vaccinal de deux de ces élevages était inconnu ; pour les autres élevages, la vaccination était effectuée (voir le tableau 2).

DISCUSSION

Nombre et motifs de soumissions

Le nombre de prélèvements soumis à notre service d'aide au diagnostic de la maladie de Gumboro a fortement augmenté d'une année sur l'autre (x 2,7 sur les 8 premiers mois de 2008 par rapport à 2007), correspondant à une implication d'un plus grand nombre de vétérinaires aviaires. Les motifs prédominants de ces soumissions sont en cohérence avec les objectifs de ce service (dégradation de

performances d'un lot et/ou de lot(s) précédent(s)). La mise en évidence de 3 variants en 2007 a incité les vétérinaires à soumettre plus de prélèvements en 2008. L'absence régulière de commémoratifs renseignés peut néanmoins être regrettée. En revanche, le nombre faible de prélèvements inexploitable est une source de satisfaction.

Identification de virus IBDV variant

Pour 3 prélèvements de 2007 et 14 de 2008, la séquence en acides aminés déduite de la séquence génétique obtenue pour la portion variable de la VP2 séquencée au laboratoire du GD de Deventer (Pays-Bas) présente des similitudes avec les mutations signalées récemment sur des souches provenant d'élevages français (Jackwood, 2006). L'hétérogénéité observée en 328 ne permet pour l'instant pas de les rassembler au sein d'une même souche. Pour l'essentiel, les lots correspondants présentaient des signes cliniques compatibles avec l'infection par un IBDV et étaient vaccinés selon un protocole satisfaisant. Toutefois, le statut vaccinal de deux des élevages n'était pas connu, et la pratique de la vaccination à demi-dose dans un troisième ne permet pas de considérer ces lots comme protégés vis-à-vis du virus classique. Néanmoins, les mutations observées dans les séquences correspondantes (D en 318 et E en 323) sont localisées dans le pic hydrophile majeur B de la protéine VP-2 de l'IBDV. Cette région est la plus importante pour les modifications antigéniques de l'IBDV, permettant aux mutants d'échapper à une protection immunitaire établie vis-à-vis de souches classiques (Schnitzler, 1993). Pris dans leur ensemble, ces éléments convergent en faveur de l'identification d'un variant de l'IBDV circulant en France, et proche du variant Nord-Américain Delaware E. Il s'en distingue toutefois, en particulier à la position 328 (à l'extérieur du pic hydrophile majeur de la VP2) par la présence d'une lysine (K) ou d'une thréonine (T), et non d'une sérine (S) (voir figure 1) ainsi que par la présence d'une thréonine (T) à la place de la sérine (S) en position 222 (donnée non présentée). Enfin, la proportion de variants identifiés dans le cadre de cette surveillance paraît en croissance (14 % des résultats positifs en RT-PCR en 2007, contre 25 % pour les 8 premiers mois de 2008), mais il paraît encore prématuré de qualifier définitivement ce phénomène d'émergent.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Anonyme, 2008. In : décret n° 2008-1155 du 7 novembre 2008, JORF du 9/11/2008. <http://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000019736196&dateTexte=>
- Jackwood D.J. et al., 2006. *Avi. Dis.*, (50), 532-536.
- Lukert P., Saif M., 1997. In : *Diseases of Poultry* (10th edition). Iowa state University Press, Ames, IA, pp. 721-738.
- Schnitzler D. et al., 1993. *J. Gen. Virol.*, (74), 1563-1571.

Stewart-Brown B., 1990. In : Proc. 25th Nat. Meet. Poultry Health Condemn., pp 134-135.

Commémoratifs	Fréquence des observations (sur 27 fiches renseignées en 2007)	Fréquence des observations (sur 41 fiches renseignées en 2008)
Troubles digestifs	3 (11,1 %)	6 (14,6 %)
Amaigrissement	1 (3,7 %)	0 (-)
Mortalité légère	1 (3,7 %)	4 (9,8 %)
Gumboro clinique	4 (14,8 %)	3 (7,3 %)
Baisse des performances	10 (37,0 %)	18 (43,9 %)
Baisses des performances sur le lot précédent	6 (22,2 %)	15 (36,6 %)
Litière grasse	3 (11,1 %)	2 (4,9 %)
Grosse tête	1 (3,7 %)	1 (2,4 %)
Réovirose	1 (3,7 %)	0 (-)
Coccidiose	0 (-)	4 (9,8 %)

Tableau 1 : Fréquence des commémoratifs renseignés sur les prélèvements de 2007 et sur les 8 premiers mois de 2008.

Année	Code	Vaccination renseignée
2007	1A07 – 020	“Chaud” à J15
	1A07- 038	“Chaud” à J15
	1A07 - 028	Intermédiaire, 2 fois à une semaine d’intervalle
2008	1A08-097	“Chaud” à J17
	1A08-040	Intermédiaire à J18
	1A08-053	“Chaud” à J18
	1A08-055	Inconnue
	1A08-044	Inconnue
	1A08-039	Intermédiaire à J14 et J21
	1A08-063	Intermédiaire à J8, J14 et J26
	1A08-062	Intermédiaire à J8, J14 et J26
	1A08-049	Intermédiaire à J17, J24, à demi-dose
	1A08-007	Intermédiaire à J18
	1A08-006	Intermédiaire à J18
	1A08-005	Intermédiaire à J18
	1A08-064	Intermédiaire à J7, J14 et J25
	1A08-066	Intermédiaire à J8, J14 et J24

Tableau 2 : Protocoles vaccinaux observés dans les élevages où un virus candidat au statut de nouveau variant a été identifié.

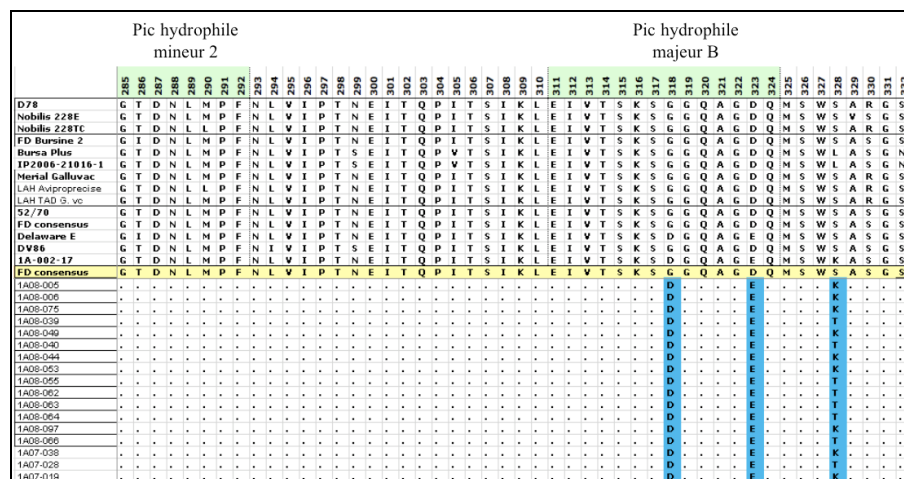


Figure 1 : Séquence en acides aminés déduite de la séquence génétique obtenue pour la portion variable de la VP2 des souches d'IBDV identifiées en 2007 et 2008 comme compatibles avec le statut de variant. Les séquences sont alignées et comparées à une séquence consensuelle. Les homologies sont figurées par un point, les divergences sont signalées par la lettre symbolisant chacun des acides aminés selon la nomenclature internationale. Le pic hydrophile majeur B est la région de la protéine VP-2 la plus importante pour les modifications antigéniques de l'IBDV permettant aux mutants d'échapper à une protection immunitaire établie vis-à-vis de souches classiques.