EPIDEMIOLOGIE MOLECULAIRE DE LA BURSITE INFECTIEUSE AVIAIRE EN ALGERIE

M. Abed[1], S. Soubies[2], C. Courtillon[2], F-X. Briand[2], C. Allée[2], A. Bellahouel[4], M.Amelot[3] D. Khelef[1], S. Temim[1]et N. Eterradossi[2]

[1]ENSV d'Alger -Rue Issad Abbes, Oued Smar-16000 Alger, Algérie
[2]ANSES – Unité VIPAC - Rue des Fusillés, 22440 Ploufragan, France
[3]ANSES - SELEAC - Rue des Fusillés, 22440 Ploufragan, France
[4]Cabinet Vétérinaire, Beni Slimane, 26000 Médéa, Algérie

nicolas.eterradossi@anses.fr

RÉSUMÉ

La bursite infectieuse aviaire est une maladie virale immunodépressive, présente mondialement, qui provoque mortalité, retard de croissance, et favorise les affections secondaires chez le jeune poulet. L'agent responsable, noté IBDV, est un virus non enveloppé au génome constitué de deux segments d'ARN double brin. Le segment A code notamment pour la protéine de capside, cible des anticorps neutralisants, tandis que le segment B code pour la polymérase virale, les deux protéines contribuant au pouvoir pathogène. Différents pathotypes d'IBDV ont été décrits, allant des souches vaccinales atténuées aux virus hypervirulents (notés vvIBDV). Afin d'étudier l'épidémiologie moléculaire de la bursite infectieuse aviaire en Algérie, les bourses de Fabricius provenant de 35 élevages de poulet de chair suspects de bursite infectieuse ont été analysées. Une caractérisation génétique, antigénique et une étude du pouvoir pathogène de certaines souches ont été effectuées. La présence d'IBDV a été confirmée par RT-PCR dans 69% (24/35) des 35 épisodes cliniques étudiés et le séquençage partiel des segments A et B a permis une analyse phylogénétique des souches détectées, révélant 45% de souches apparentés aux vvIBDV et 16% (proches de souches vaccinales. Par ailleurs, 39% des souches présentaient un profil évocateur de réassortiment, avec un segment A apparenté aux vvIBDV associé à un segment B d'origine indéterminée. La pathogénicité de ces dernières souches sur poulets EOPS s'est avérée expérimentalement comparable à celle des virus hypervirulents de référence. Ces données révèlent la diversité des souches d'IBDV circulant en Algérie et contribueront à une prise en charge plus adaptée de la maladie.

ABSTRACT

Molecular epidemiology of infectious bursal disease in Algeria

Infectious bursal disease (IBD) is an immunosuppressive viral disease, present worldwide, which causes mortality, growth retardation, and leads to secondary affections in young chickens. The causative agent, denoted IBDV, is a non-enveloped virus whose genome consists of two segments (A and B) of double-stranded RNA. Segment A encodes, in particular, the capsid protein, the target of neutralizing antibodies, while segment B encodes the viral polymerase, both proteins contributing to pathogenicity. Different pathotypes of IBDV have been described, ranging from attenuated vaccine strains to hypervirulent viruses (noted vvIBDV). This study aims at characterizing some IBDV strains that circulated in Algeria between 2014 and 2015. The presence of IBDV was confirmed by RT-PCR in 69% of the 35 clinical episodes studied. Partial sequencing of segments A and B allowed a phylogenetic analysis of the detected strains. Forty-five percent of the analyzed strains were related to vvIBDV, 16% were related to vaccine strains and 39% had a reassortant profile, with a segment A related to vvIBDV associated with a segment B of undetermined origin. The pathogenicity of the latter strains for SPF chickens was found experimentally to be comparable to that of the very virulent reference viruses. These data reveal the diversity of strains of IBDV circulating in Algeria and will contribute to a more adapted management of the disease.

INTRODUCTION

La bursite infectieuse aviaire (ou l'IBD pour *Infectious Bursal Disease*), également nommée maladie de Gumboro, est une maladie virale immunodépressive. Elle représente une dominante pathologique dans tous les pays à aviculture industrialisée et cause des pertes directes (forme aiguë de la maladie) ou indirectes (forme immunodépressive favorisant les surinfections). Le virus causal est nommé IBDV (*Infectious Bursal Disease Virus*). Deux sérotypes sont connus pour l'IBDV : les virus du sérotype 1 sont responsables de la maladie chez la volaille tandis que les virus de sérotype 2 ne sont pas pathogènes. Le matériel génétique de l'IBDV se compose de deux segments d'ARN double brin nommés segments A et B. Le segment A code entre autres pour la protéine de capside VP2, présente à la surface du virus et cible des anticorps neutralisants induits par la vaccination. Le segment B code pour la protéine VP1, la polymérase virale, qui module la vitesse de réplication virale. Il existe différents pathotypes viraux, allant des souches vaccinales atténuées aux virus hypervirulents (notés vvIBDV). Les deux segments contribuent à la pathogénicité virale. Ce matériel génétique permet au virus d'évoluer entre autres par mutations ponctuelles et par réassortiment. Les mutations ponctuelles peuvent modifier la séquence de VP2 et permettre au virus d'échapper aux anticorps vaccinaux, comme dans le cas des virus variants antigéniques détectés aux USA à partir de 1984. Le réassortiment survient lorsque les cellules sont co-infectées par deux souches virales différentes. Le segment A d'un des virus parentaux peut se retrouver associé au segment B de l'autre virus parental, produisant des virus aux propriétés nouvelles. Différents réassortiments ont été décrits pour des virus isolés en Asie, en Afrique, aux Etats-Unis et en Europe **(Eterradossi et Saif, 2013, Soubies et al, 2016).**
En Algérie, malgré les mesures de prophylaxie déployées, des cas de bursite infectieuse aviaire sont souvent diagnostiqués, sur la base d'éléments cliniques et lésionnels **(Alloui, 2015).** L'épidémiologie moléculaire des souches d'IBDV algériennes reste méconnue. La présente étude vise à obtenir une vision actualisée de la diversité génétique, antigénique et de la pathogénicité d'un échantillon de souches circulantes en Algérie et contribuera à la mise en place d'une prophylaxie plus adaptée à la situation du terrain algérien.

1. MATERIEL ET METHODES

1.1 Echantillons

Un total de 190 Bourses de Fabricius a été prélevé entre septembre 2014 et septembre 2015, lors de 35 épisodes cliniques attribués à l'IBD (nombre de bourses varie entre 2 et 8 par élevage) dans des élevages de poulet de chair situés dans les régions du centre de l'Algérie (Tableau 1). Toutes les bourses présentaient des lésions de congestion, œdème, hémorragie ou atrophie. Les bourses ont été stockées à -20°C jusqu'à leur analyse.

1.2 Virus de référence

Les souches d'IBDV F52/70 **(Bygrave et Faragher, 1970)** et 89163 **(Eterradossi et al, 1992)** ont été respectivement utilisées comme référence pour les souches classiques (cvIBDV), ou hypervirulentes (vvIBDV) dans l'étude du pouvoir pathogène.

1.3 Préparation et traitement de l'homogénat de bourses de Fabricius

Les bourses ont été broyeés avec du PBS (pds/vol) puis traitées (vol/vol) avec du 1,1,2-Trichloro-1,2,2 Trifluoroéthane pour éliminer les débris cellulaires. Les suspensions virales ainsi obtenues ont été traitées au chloroforme (vol/vol) pendant une nuit à 4°C afin d'inactiver d'éventuels contaminants viraux enveloppés.

1.4 Extraction de l'ARN

L'ARN viral a été extrait à l'aide du Kit QIAamp RNA Mini kit (Qiagen) puis a été conservé à -70°C.

1.5 RT-PCR, Séquençage et analyses phylogénétiques

Le séquençage partiel des deux segments A et B a été effectué à partir des produits de la RT-PCR selon les méthodes du manuel de l'OIE **(Anonyme, 2016).** Les séquences apparentées aux séquences obtenues ont été recherchées avec BLAST dans la base de données GenBank. Les séquences nucléotidiques disponibles les plus proches ont été récupérées pour l'analyse phylogénétique. Les alignements nucléotidiques et aminopeptidiques ont été réalisés à l'aide de Clustal W (logiciel Mega version 7). Les arbres phylogénétiques ont été construits par Neighbor-joining et la robustesse de leur topologie a été vérifiée par la méthode de Bootstrap avec 1000 réplications. Les valeurs de Bootstrap inférieures à 75 ont été jugées non significatives.

1.6 Recherche de contaminants viraux et titrage sur œufs embryonnés

Les souches virales sélectionnées pour l'étude expérimentale ont fait l'objet d'une recherche de contaminants viraux : après neutralisation de la suspension virale avec un sérum anti-IBDV, trois passages sériés ont été effectués sur œufs embryonnés de poules EOPS (voies intra-vitelline, allantoïdienne et sur la membrane chorio-allandoïdienne) ainsi que sur cultures primaires d'hépatocytes d'embryons de

poulets. Les stocks viraux reconnus comme non contaminés ont été titrés sur œufs EOPS embryonnés de 9 à 11 jours. Le titre viral a été calculé en utilisant la méthode de Reed et Munch.

1.7 Expérimentations animales

Les expérimentations animales ont été approuvées par le comité d'éthique Anses/ENVA/UPEC et le ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche.

1.7.1 Production *in vivo* de stocks viraux

Des poulets White Leghorn EOPS âgés de 6 semaines, et élevés en atmosphère protégée ont été inoculés par voie intranasale à raison de 0.1ml par oiseau de suspension virale. Après 4 jours, les poulets ont été euthanasiés, leurs bourses de Fabricius prélevées et traitées comme décrit dans le chapitre 1.3.

1.7.2 Etude du pouvoir pathogène

Deux expérimentations ont été menées pour l'étude du pouvoir pathogène. Des poulets EOPS (même caractéristiques et hébergement qu'en 1.7.1) ont été bagués, pesés et répartis en groupes de 15 à 20 poulets après harmonisation des sexes et des poids. Des prises de sang individuelles ont été réalisées afin de confirmer avant inoculation le statut séronégatif vis à vis de l'IBDV. Tous les groupes ont été inoculés par voie intra-nasale (10^5 EID_{50} par oiseau). Dans les deux expérimentations, un groupe témoin non infecté (NI) a été inoculé avec une solution saline. La morbidité (index symptomatique tel que décrit par **Soubies et al**, **2016**) ainsi que le taux de mortalité ont été notés quotidiennement de J1 à J21.
A J4 post-infection pour 5 sujets et à J21 post-infection pour les survivants, les poulets ont été pesés, euthanasiés et autopsiés. Leurs bourses de Fabricius ont été prélevées et pesées afin de calculer le ratio poids de la bourse/poids du poulet (pB/pP).

1.8 Analyse statistique

Les taux de mortalité ont été comparés avec le test du χ^2. Les ratios pB /pP ont été comparés avec le test non paramétrique de Kruskal-Wallis.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1 Diagnostic moléculaire

Des résultats de RT-PCR positifs ont été obtenus chez 24 (69%) des 35 échantillons. Dans 22 de ces prélèvements, les quantités de produit d'amplification obtenues ont été suffisantes pour permettre le séquençage partiel des segments A et B ou le séquençage d'au moins un segment (3 souches avec séquences partielles du segment A et une souche avec uniquement le séquençage du segment B). L'absence de virus dans les échantillons négatifs peut être expliquée par l'absence du virus dans la bourse de Fabricius (prélèvement trop tardif ou atrophie de la bourse due à une autre étiologie).

2.2 Comparaison des séquences et analyses phylogénétiques

L'analyse phylogénétique du segment A révèle la répartition des 18 souches étudiées en deux groupes: le premier regroupe la majorité des souches séquencées dans un clade contenant aussi les souches vvIBDV asiatiques et européennes (groupe I, valeur de bootstrap de 86%). Le deuxième est apparenté à la souche vaccinale IBDL (valeur de bootstrap à 100%, groupe II dans la figure 1).
L'analyse des séquences aminopeptidiques de la région hypervariable de VP2 (segment A) a révélé i) une identité stricte entre les souches du groupe I et la souche vaccinale IBDL, ii) une identité stricte entre les souches du groupe II et la souche 89163 sauf chez les deux souches 150128 et 150133 où une mutation S→G, déjà observée chez des vvIBDV européens **(Martin et al, 2007)** est observée à la position 254.
L'analyse phylogénétique du segment B révèle également une répartition en deux groupes. Le premier comprend les virus vvIBDV (groupe I) avec six souches algériennes et les vvIBDV européens et asiatiques (bootstrap 96%), ainsi que deux souches (150133 et 150128, groupe I.a, bootstrap 99%), plutôt apparentées à la souche ivoirienne 88180 (bootstrap 78%).
Le second groupe comprend un ensemble de souches atténuées (groupes III), classiques (groupe IV), variantes antigéniques ainsi que les souches du sérotype 2. On retrouve dans ce second groupe trois souches algériennes, qui semblent apparentées à la souche vaccinale IBDL (quoiqu'avec un bootstrap <75%), ainsi que sept souches partageant une origine géographique commune et qui forment un groupe VI (valeur de bootstrap : 100%) ne pouvant être relié à aucune séquence de référence. L'alignement des séquences aminopeptidiques partielles du segment B de ces sept souches révèle l'absence d'un triplet d'acides aminés présenté comme caractéristique des vvIBDV européens (positions 145T, 146D et 147N) et la présence à ces positions d'acides aminés (145N, 146E, 147G) retrouvés chez les souches d'IBDV de sérotype 2 ou adaptées à la culture cellulaire.

Globalement, une co-évolution des segments A et B a été observée, sauf pour les virus du groupe VI, qui représentent des virus réassortants possédant une VP2 apparentée aux vvIBDV et une VP1 d'origine inconnue. Un séquençage complet pourrait contribuer à clarifier les parentés génétiques de ce segment B original.

2.3 Pouvoir pathogène

L'étude du pouvoir pathogène a concerné quatre souches dotées d'un génotype soit typique des vvIBDV (150136), soit apparenté à la souche vaccinale (150127), soit réassortants (150144 et 150124). Voir Tableau 2

Dans l'expérimentation animale 1, le pouvoir pathogène des souches 150136 (vvIBDV typique) et 150127 (apparentée aux souches vaccinales) a été comparé à celui des souches de référence 89163 (vvIBDV) et F52/70 (cvIBDV). A J4 post-infection, les souches 89163 et F52/70 ont induit respectivement 15% et 10% de mortalité. Les souches algériennes 150127 et 150136 n'ont induit aucune mortalité ($p>0.05$). Les signes cliniques ont été plus sévères (score symptomatique ≥ 2) dans les groupes 89163 (taux de morbidité à 55%), F52/70 (40%), et 150136 (40%) que dans le groupe 150127 (5%) ou NI (0%) *($p\leq0.05$).* Les ratios pB/pP dans les groupes F52/70, 89163 et 150136 étaient significativement plus faibles à J21 p.i que dans le groupe NI (ratios variant entre 0,7 et 0,8‰ versus 3.04‰ pour NI), la souche 150127 induisant quant à elle des ratios intermédiaires entre les groupes précédents (ratio 1.06‰, $p>0.05$).

Au final, l'expérimentation animale 1 révèle l'absence de mortalité induite par la souche 150136 en dépit d'un profil génétique apparenté aux souches vvIBDV. Ce résultat est à rapprocher de celui de la souche de référence 89163 qui n'a induit que peu de mortalité ($p>0.05$ avec le groupe NI). L'étude du pouvoir pathogène de ces souches doit être reconduite et si l'absence de mortalité induite par la souche 150136 est confirmée, un séquençage complet sera nécessaire pour déceler les mutations susceptibles d'être responsables de cette caractéristique. En revanche, la souche 150127 présente un pouvoir pathogène cohérent avec son génotype apparenté aux souches vaccinales intermédiaires plus (faible morbidité, absence de mortalité et atrophie de la bourse de Fabricius).

Dans l'expérimentation 2, le pouvoir pathogène des deux souches réassortantes 150144 et 150124 a été comparé au pouvoir pathogène de la souche vvIBDV de référence. A J4 post-infection, la mortalité et la morbidité enregistrées dans les différents groupes inoculés étaient élevées ($p\leq0.05$ par rapport au groupe NI) mais non significativement différentes entre elles (mortalité de 33 à 55 % et morbidité de 53 à 60%, comme habituellement obtenu avec la souche 89163, Tableau 2). Les souches réassortantes 150124 et 150144 semblent donc comparables à la souche vvIBDV de référence. Dans la littérature scientifique, des souches réassortantes intersérotypiques ou intrasérotypiques possédant un segment A apparenté aux vvIBDV ont été identifiées **(Sun et al, 2003 ; Le Nouen et al, 2006 ; Kasanga et al, 2012 ; Jackwood et al, 2011 ; Li et al, 2015, Soubies et al, 2016)**. La plupart d'entre elles présentent un pouvoir pathogène diminué à l'exception des réassortants chinois **(Li et al, 2015)** dont le segment B appartient à une lignée génétique différente (groupe VII, figure 1).

CONCLUSION

Dix-huit souches d'IBDV responsables de cas aigus ayant circulé en Algérie entre 2014 et 2015 ont été caractérisées sur le plan moléculaire. Les résultats obtenus montrent la présence de souches hypervirulentes et apparentées aux vaccins utilisés sur le terrain, mais aussi la circulation de souches réassortantes virulentes. Les séquences amino-peptidiques de la région hypervariable de ces souches ne suggèrent aucun échappement antigénique à la couverture vaccinale. La vaccination reste un moyen incontournable dans la lutte contre l'IBD. Cependant, les échecs de vaccination observés sur le terrain peuvent être liés à i) des mesures de biosécurité insuffisantes, ii) une conduite vaccinale inappropriée et à iii) la vitesse de réplication des souches hypervirulentes qui pourrait contribuer à leur capacité à échapper à l'immunité passive (capacité réplicative à évaluer expérimentalement).

Les résultats de l'étude du pouvoir pathogène montrent l'intérêt de la caractérisation des deux segments A et B. Un séquençage complet des deux segments est en cours pour les souches réassortantes afin de tenter d'identifier l'origine de leur segment B.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Alloui N., Sellaoui S., Onziemes journées de la recherche avicole et palmipèdes à Foie Gras., Tours., les 25 et 26 mars 2015.
- Anonyme,. (2016). Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals: OIE – World Orga nisation for A nimal Health
- Bygrave, A.C., Faragher, J.T., 1970. Vet.Rec. 86, 758–759.
- Eterradossi, N., Picault, J.P., Drouin, P., Guittet, M., L'Hospitalier, R., Bennejean, G.,1992.. J. Vet. Med.B39,683–691.
- Jackwood, D.J., Sommer-Wagner, S.E., Crossley, B.M., Stoute, S.T., Woolcock, P.R., Charlton, B.R., 2011. Virology 420, 98–105.
- Kasanga, C.J., Yamaguchi, T., Munang'andu, H.M., Ohya, K. &
- Le Nouen, C., Rivallan, G., Toquin, D., Darlu, P., Morin, Y.,Beven, V., de Boisseson, C., Cazaban, C., Comte, S., Gardin, Y. & Eterradossi, N. (2006). Journal of General Virology, 87, 209–216.
- Martin, A.M., Fallacara, F., Barbieri, I., Tosi, G., Rivallan, G., Eterradossi, N. & Cordioli, P. (2007). Avian Diseases,51,863-872.
- Soubies S., Courtillon C., Briand F-X., Queguiner-Leroux M., CourtoisD., Amelot M., Grousson K., Morillon P., Herin J-B., and Eterradossi N., Avian Pathol. 2016 Oct 17:1-9
- Sun JH1., Lu P., Yan YX., Hua XG., Jiang J., Zhao Y., J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health. 2003 Apr;50(3):148-54.
- Wei, Y., Li, J., Zheng, J., Xu, H., Li, L. & Yu, L. (2006). Biochemical and Biophysical Research Communcations, 350, 277–287
- Wei, Y., Yu, X., Zheng, J., Chu, W., Xu, H., Yu, X. & Yu, L. (2008). Virus Research, 131, 279–282.

Tableau 1. Commémoratifs des épisodes cliniques correspondant aux 18 virus présentés

Référence de la souche	Régions	Effectif (nombre)	Vaccination	Age des poulets (jours)	Mortalité (nombre)
150124	Tablate	3600	IBDL / 14 jrs	30	100
150142	Berrouaghia	4000	IBDL / 14 jrs	31	10
150123	Alger	4700	Pas de données	33	40
150143	Alger	2000	IBDL / 14 jrs	27	40
150131	Médéa	1400	E228	31	30
150139	TABLATE	3500	INTER GUM L	30	55
150140	Alger	5000	IBDL / 14 jrs	32	40
150134	Alger	2800	IBDL / 14 jrs	52	40
150129	Médéa	1500	IBDL / 14 jrs	37	40
150130	Tablate	1400	E228	28	30
150144	BENI SLIMANE	2500	IBDL / 14 jrs	30	25
150126	Beni Slimane	2500	Non vacciné	38	200
150136	Médéa	1600	IBDL / 14 jrs	29	12
150133	Chelef	2000	Pas de données	27	20
150127	Tizi-Ouzou	5500	Pas de données	36	40
150128	Tizi-Ouzou	3500	Pas de données	31	25
150152	Tizi-Ouzou	3000	Pas de données	30	21
150150	Ain Defla	3000	Non vacciné	28	15

Tableau 2. Pouvoir pathogène des souches étudiées

Paramètre	Expérimentation 1					Expérimentation 2			
	NI	F52/70	89163	150127	150136	NI	89163	150124	150144
Mortalité cumulée à J4 P.I (%)	0^{a}	10^{a}	15^{a}	0^{a}	0^{a}	0^{a}	33.3^{b}	31.5^{b}	55.5^{b}
Ratio pB/pP									
A J4 P.I	4.3±0.7	4.8±1.02	3.4±0.8	4.2±1.9	5.2±0.8	2.7±0.3	3.7±1.1	4.2±1.2	3.5±0.8
A J21 P.I	3.04 ± 0.5^{ac}	0.8 ± 0.1^{b}	0.7 ± 0.2^{b}	1.06 ± 0.2^{c}	0.8 ± 0.2^{b}	3.04 ± 0.5^{a}	0.4 ± 0.1^{b}	0.5 ± 0.1^{b}	0.6 ± 0.1^{b}
Morbidité à J4 P.I (%)	0^{a}	40^{b}	55^{b}	5^{b}	40^{b}	0^{a}	60^{b}	52.6^{b}	61.1^{b}

- a,b,c des lettres différentes sont associées aux valeurs statistiquement différentes ($P \leq 0.05$)

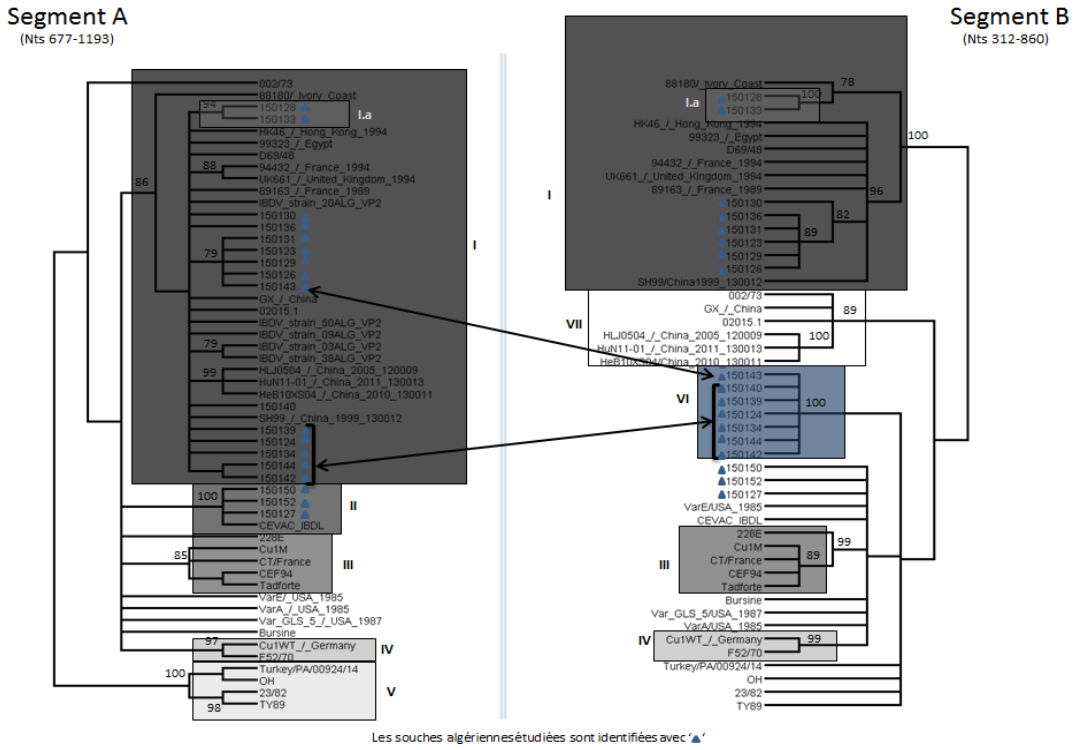

Figure 1 : Arbres phylogénétiques des segments A et B partiels des virus IBDV : Les cadres soulignent les groupes génétiques ; les flèches relient les segments des souches réassortantes.