

République Algérienne Démocratique et
Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et la
Recherche Scientifique
Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
المدرسة الوطنية العليا للبيطرة



THESE

En vue de l'obtention du diplôme de Doctorat Es-sciences
en Sciences Vétérinaires

Thème

Caractérisation génétique, antigénique et pathotypique du virus de la bursite infectieuse aviaire en Algérie

Présentée par : **Mouna ABED**

Soutenue le 06 septembre 2018

Devant le jury composé de :

Présidente : Pr AIT AOUDHIA Khatima	ENSV Alger
Examineur 1 : Pr MENOUIRI Nabil	ISV Blida
Examineur 2 : Dr AZZAG Naouelle	ENSV Alger
Examineur 3 : Pr AOUN Leila	Université El Tarf
Examineur 4 : Pr KORICHI-OUAR Mounira	Faculté de médecine d'Alger
Encadreur : Pr KHELEF Djamel	ENSV Alger
Co-encadreur : Dr ETERRADOSSI Nicolas	ANSES Ploufragan-France

Année universitaire : 2017/2018

République Algérienne Démocratique et
Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et la
Recherche Scientifique
Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
المدرسة الوطنية العليا للبيطرة



THESE

En vue de l'obtention du diplôme de Doctorat Es-sciences
en Sciences Vétérinaires

Thème

Caractérisation génétique, antigénique et pathotypique du virus de la bursite infectieuse aviaire en Algérie

Présentée par : **Mouna ABED**

Soutenue le 06 septembre 2018

Devant le jury composé de :

Présidente : Pr AIT AOUDHIA Khatima	ENSV Alger
Examineur 1 : Pr MENOUIRI Nabil	ISV Blida
Examineur 2 : Dr AZZAG Naouelle	ENSV Alger
Examineur 3 : Pr AOUN Leila	Université El Tarf
Examineur 4 : Pr KORICHI-OUAR Mounira	Faculté de médecine d'Alger
Encadreur : Pr KHELEF Djamel	ENSV Alger
Co-encadreur : Dr ETERRADOSSI Nicolas	ANSES Ploufragan-France

Année universitaire : 2017/2018

Abréviations

Aa : acide aminé
AcM : anticorps maternel
AcMo : anticorps monoclonal
AC-ELISA : Antigen-Capture ELISA
ADN : acide désoxyribonucléique
ADNc : ADN complémentaire rétrotranscrit
ARN : Acide ribonucléique
ARNm : ARN messenger
ARNdb : ARN double brins
Blast : basic local alignment search tool
BdF : bourse de Fabricius
b/B : Bursa to body-weight ratio
CEF : Chicken Embryo Fibroblast
DPI : Days post-infection
ECP : effet cytopathogène
EID₅₀ : median embryo infectious dose
ELISA : Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EOPS : Exempt d'organismes Pathogènes Spécifiques
IBD : Infectious Bursal Disease
IBDV : Infectious Bursal Disease Virus
IDG : Immunodiffusion double en gélose`
IFN : Interféron
IL : Interleukine
kDa : Kilo Dalton
LB : Lymphocytes B
LT : Lymphocytes T
MCA ou CAM : membrane choriallantoidienne
NGS : next generation sequencing
NK : natural killer
nt : nucléotide
OIE : Office National des Epizooties
ORF : Open reading Frame
p.i. : post-infection
RdRp : RNA-dependent RNA-polymerase
RLFP : Restriction Fragment Length Polymorphism
RNC : Régions non codantes
RT-PCR : reverse transcription-polymérase chain reaction
SN : séroneutralisation
SPF : specific pathogens free
vvIBDV : very virulent IBDV

Listes des Figures

Présentation bibliographique

Figure 1 : Estimation de la date d'apparition (« Time of emergence of the most recent common ancestor », TMRCA) de chacun des deux segments A et B des vvIBDV et des premiers vvIBDV par différentes approches. (P 18)

Figure 2 : Morphologie de particules virales d'IBDV observées en microscopie électronique à transmission après purification par gradient de Chlorure de Césium. Coloration à l'acide phosphotungstique. (P 20)

Figure 3 : Modèle de capsidite d'IBDV d'ordre T=13, à 10Å de résolution. (P 20)

Figure 4 : Structures secondaires prédites d'ARN des séquences terminales des segments A et B de la souche IBDV (OH) qui appartient au sérotype 2. (P 22)

Figure 5 : Représentation schématique des segments génomiques A et B et des protéines issues de ces segments. (P 23)

Figure 6 : Représentation schématique des protéines virales du segment A et des domaines fonctionnels connus pour chaque protéine. (P 27)

Figure 7 : Localisation aminopeptidique des zones antigéniques de la protéine VP2 et représentation de ces séquences sur la capsidite d'IBDV d'ordre T=13. (P 29)

Figure 8 : Représentation d'un trimère de VP2 sous la forme d'un diagramme ruban (vue de gauche, de profil, vue de droite, vue de dessus). (P 30)

Figure 9 : Représentation schématique de la protéine virale VP1 du segment B et des motifs connus ou suspectés pour cette protéine. (P 35)

Figure 10 : Schéma représentant un modèle proposé pour la transcription de l'IBDV. (P 40)

Figure 11 : Répartition géographique mondiale de l'IBD selon sa forme d'expression déterminée à partir d'une enquête de l'OIE (P 45)

Figure 12 : Symptômes observés à 4 jours post-infection chez un poulet EOPS de 6 semaines infecté par une souche hypervirulente d'IBDV. (P 48)

Figure 13 : Hypertrophie et œdème de la séreuse de la bourse de Fabricius (aspect gélatineux). (P 50)

Figure 14 : Bourse de Fabricius hémorragique. (P 50)

Figure 15 : Hémorragies au niveau des muscles de la cuisse. (P 51)

Figure 16 : Hémorragies du proventricule lors d'infection par l'IBDV. (P 51)

Figure 17 : Analyse de coupes de bourse de Fabricius (BdF) de poulets EOPS âgés de 6 semaines (Grossissement X40). (P 53)

Figure 18: Embryons de poulet EOPS âgés de 10 jours ; à droite, embryon sain non inoculé, à gauche, des embryons lésés par une souche Algérienne réassortante d'IBDV. (P 61)

Travaux personnels

Figure 19: Condensed consensus phylogenetic trees deduced from the partial sequences for segment A (left) and segment B (right) of Algerian and reference IBDV strains using the neighbor-joining method. (P 80)

Figure 20: Mean individual symptomatic index for surviving chickens from 1 to 10 DPI for animal experiments 1 (A), 2 (B) and 3 (C). (P 88)

Supplementary figure 1: Amino acid differences in VP2 partial sequences between. (P 103)

Supplementary figure 2: Amino acid differences in VP2 partial sequences between reference strains and the studied Algerian strains. (P 103)

Supplementary figure 3: Condensed consensus phylogenetic trees deduced from the full-length genome segment A (left) and segment B (right) of 41 IBDV strains using the neighbor-joining method. (P 104)

Liste des tableaux

Présentation bibliographique

Tableau 1 : Reassortants naturels de l'IBDV selon la bibliographie. (P 42)

Tableau 2 : Recombinants naturels d'IBDV selon la bibliographie. (P 43)

Tableau 3 : Diagnostic différentiel de l'IBD avec les autres maladies chez la volaille. (P 59)

Travaux personnels

Table 4: Amino acids differences in VP2 complete sequence between Algerian strains and reference strains. Grey boxes show aa identity with 89163. (P 83)

Table 5: Amino acids differences in VP1 complete sequence between vvIBDV Algerian related strains and reference strain 89163. Grey boxes show aa identity with 89163. (P 83)

Table 6: Amino acid differences in VP1 complete sequence between 150124 and 150144 reassortant Algerian strains and reference strains. Grey boxes show aa identity with 23/82. (P 85)

Table 7: Antigenic characterization of selected Algerian IBDV isolates (150124, 150127, 150128 and 150136) compared to the antigenicity of IBDV strains Faragher 52/70 (classical serotype 1), 89163 (typical vvIBDV), in Antigen-Capture ELISA (AC-ELISA). (P 85)

Table 8: Pathogenicity analyses (mean BBW ratio and cumulated mortality) of Algerian IBDV strains in 6-week-old SPF chickens, comparing with classical virulent strain F52/70 and/or the typical vvIBDV strain 89163 as reference controls. (P 87)

Supplementary table 1: Background clinical information, PCR results and GenBank accession number of the studied recent Algerian isolates (from 2014 and 2015). (P 99)

Supplementary table 2: Background information, PCR results and GenBank accession numbers of the Algerian isolates collected in 2000. (P 100)

Supplementary table 3: List of GenBank accession numbers of viral strains sequences used in phylogenetic analyses. (P 101)

Sommaire

Remerciements.....	2
Abréviations.....	6
Liste des figures.....	7
Liste des tableaux	9

Présentation bibliographique

INTRODUCTION GENERALE.....	13
1 Historique et évènements épidémiologiques majeurs.....	15
1.1 Apparition de la maladie et circulation des souches virales classiques.....	15
1.2 Emergence des variants antigéniques.....	16
1.3 Emergence des souches hypervirulentes ou « vvIBDV ».....	17
2 Agent Etiologique de la maladie.....	19
2.1 Taxonomie.....	19
2.2 Morphologie.....	19
2.3 Propriétés physico-chimiques.....	21
2.4 Composition génomique et protéique de l'IBDV.....	21
2.4.1 Les régions non codantes.....	21
2.4.2 Segment A.....	24
2.4.2.1 La protéine VP5.....	24
2.4.2.2 La protéine VP2.....	28
2.4.2.3 La protéine VP3.....	32
2.4.2.4 La protéine VP4.....	33
2.4.3 Le segment B.....	34
2.5 Cycle réplicatif de l'IBDV.....	37
2.5.1 Attachement et entrée cellulaire.....	37
2.5.2 Réplication et traduction virale.....	39
2.5.3 Assemblage des protéines virales.....	40
3 Mécanismes d'évolution des virus IBDV.....	41
3.1 Réassortiment.....	41
3.2 Recombinaison.....	42
3.3 Cas particulier de mutation ponctuelle.....	44
4 Epidémiologie.....	44
4.1 Hôtes naturels et expérimentaux de l'IBDV.....	44
4.2 Distribution géographique.....	45
4.3 Facteurs de sensibilité.....	46
4.4 Transmission.....	46
5 Aspects cliniques de l'IBD.....	48
5.1 Symptômes.....	48
5.2 Mortalité et morbidité.....	49
5.3 Lésions.....	50

Sommaire

5.3.1	Lésions macroscopiques	50
5.3.2	Lésions microscopiques	50
5.3.2.1	Lésions de la bourse de Fabricius.....	52
5.3.2.2	Lésions des autres organes.....	54
6	Pathogénèse et réponse immunitaire de l'hôte	54
7	Diagnostic	59
7.1	Diagnostic virologique	59
7.1.1	Isolement viral.....	60
7.1.1.1	Isolement viral sur cultures cellulaires	60
7.1.1.2	Isolement viral sur œufs embryonnés	60
7.1.1.3	Isolement viral sur poulets	61
7.1.2	Détection des antigènes viraux	61
7.1.3	Détection du génome au moyen de techniques moléculaires.....	62
7.1.4	Caractérisation des souches d'IBDV	62
7.2	Diagnostic sérologique	63
8	Traitement	64
9	Prophylaxie	64
9.1	Prophylaxie sanitaire	64
9.2	Prophylaxie médicale.....	65
9.2.1	Vaccins vivants atténués	65
9.2.2	Vaccins inactivés.....	66
9.2.3	Vaccins recombinants ou vectorisés	67
9.2.4	Vaccins immuns complexes.....	67
9.2.5	Vaccins sous-unitaires.....	68
9.2.6	Vaccins à ADN	68

Travaux personnels

Contexte et déroulement de l'étude.....	69
1. Introduction.....	73
2. Materials and Methods.....	74
2.1 Ethics statment.....	74
2.2 Samples.....	74
2.3 Reference viruses.....	75
2.4 Previously collected Algerian IBDV isolates.....	75
2.5 Sample preparation.....	75
2.6 Reverse transcription-PCR and partial segment sequencing.....	75
2.7 Full-length sequencing of genomic segments by next-generation sequencing (NGS).....	76
2.8 Phylogenetic analyses.....	76
2.9 Antigenic characterization.....	77
2.10 Search for viral contaminants, cloning by limiting dilution and egg titration..	77
2.11 Evaluation of pathogenicity in chickens.....	77
2.12 Serological analyses.....	78
2.13 Statistical analyses.....	78
3. Results.....	79

Sommaire

3.1	RT-PCR detection of IBDV.....	79
3.2	Phylogenetic analyses based on partial sequences of segments A and B.....	79
3.3	Complete sequence analysis.....	81
3.4	Antigenic profiling.....	84
3.5	Pathogenicity.....	84
4.	Discussion.....	89
5.	Acknowledgements.....	93
6.	References.....	93
7.	Supplementary tables and figures.....	99
	DISCUSSION GENERALE.....	105
	CONCLUSION-PERSPECTIVES.....	114
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	115
	ABSTRACT.....	133

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

Le secteur avicole Algérien a connu un essor considérable durant les trois dernières décennies. L'Etat a misé sur l'aviculture intensive pour combler le déficit important en protéines animales dans la ration alimentaire (Amghrous & Bedrani, 2007).

Ce développement de la filière avicole a permis une augmentation sensible de la consommation de viande de poulet de chair. Cette dernière est passée de 0,82 kg/hab/an en 1972 à 9,18 kg/hab/an en 1986 (Fernadji, 1990) puis à 9,70 kg/hab/an. (FAO, 2005). La production de viande blanche est estimée à 500 000 tonnes en 2015, celle des œufs est de 3,5 milliards. Les poulets de chair constituent le plus grand segment de cette production animale (Alloui & Sellami, 2015).

De grands groupements avicoles existent en Algérie mais l'aviculture Algérienne reste dominée par l'implantation majoritaire de petits producteurs, qui sont particulièrement vulnérables aux différentes contraintes économiques et sanitaires.

Parmi les contraintes sanitaires que rencontre cette filière, l'émergence et la persistance de certaines maladies dans les élevages avicoles telle que la bursite infectieuse aviaire (également appelée maladie de Gumboro) pose problème (Alloui & Sellami, 2015).

La bursite infectieuse aviaire est une affection virale aiguë hautement contagieuse qui touche les jeunes poulets et qui se traduit par la destruction des lymphocytes B dans la bourse de Fabricius, provoquant de graves lésions au niveau de cet organe. Cette maladie a été décrite pour la première fois au début des années 1960 aux Etats-Unis (les premières épidémies s'étant déclarées dans la région du Delaware) et s'est depuis étendue à l'ensemble de la planète. Elle est endémique dans les grandes régions de production avicole (Etteradossi & Saif, 2013).

Malgré les nombreux efforts déployés sur le plan prophylactique, la maladie de Gumboro figure toujours au rang des plus redoutables menaces pour l'industrie avicole. En effet, les pertes directes et indirectes qu'elle occasionne ont un impact considérable sur l'économie. Les pertes économiques directes sont essentiellement dues à la mortalité provoquée par les infections aiguës. Quant aux pertes économiques indirectes, elles sont dues d'une part à l'immunodépression provoquée par l'infection virale (et qui constitue un sérieux obstacle à la vaccination) et, d'autre part, aux surinfections qui sont favorisées par l'immunodépression dégradent les performances du lot et augmentent la mortalité, la saisie des carcasses et l'utilisation des antibiotiques (Etteradossi & Saif, 2013). Des événements épidémiologiques majeurs ont marqué l'évolution des souches du virus de la maladie de

INTRODUCTION GENERALE

Gumboro. Parmi ces événements, la découverte à partir de 1984 de souches variantes aux USA dont l'antigénicité était modifiée a nécessité un changement du contenu antigénique des vaccins dans cette région (Jackwood & Saif, 1987). A partir de 1987, des souches hypervirulentes (vvIBDV), induisant des taux de mortalités très élevées (30 à 60%) sont apparues en Europe. Ces dernières ne sont antigéniquement proches des souches classiques mais sont capables de franchir la barrière d'anticorps d'origine maternelle qui protègent normalement des souches classiques (Chettle et al., 1989 ; Van den Berg et al., 1991). Plusieurs virus réassortants, au pouvoir pathogène variable, ont également été isolés depuis 2006. Enfin, un phénomène de recombinaison génétique de ce virus a été suggéré chez plusieurs isolats IBDV mais à notre connaissance aucune donnée expérimentale n'a à ce jour démontré l'existence de phénomène chez l'IBDV.

En Algérie, les premiers cas de maladie de Gumboro ont été signalés à la fin des années 1980 juste après l'émergence des souches vvIBDV en Europe (Allamigeon et Comte, 2001). En 2000, dans le cadre d'une enquête menée par l'OIE, l'unité VIPAC du laboratoire ANSES de Ploufragan (laboratoire de référence OIE sur la bursite infectieuse aviaire) a réalisé une étude de caractérisation génétique et antigénique de plusieurs isolats d'IBDV provenant de plusieurs pays du monde dont l'Algérie. La présence des souches hypervirulentes (vvIBDV) a été confirmée sur la base du séquençage partiel du segment A de l'IBDV (protéine de capsid VP2) à partir de sept isolats terrain. Dans GenBank, il existe d'autres rapports de séquences partielles d'IBDV pour VP2 génétiquement liées à vvIBDV provenant d'Algérie (Boudaoud, A., non publié), mais les rapports décrivant ces souches et surtout leur phénotype n'ont pas encore été publiés.

Actuellement, des cas de bursite infectieuse aviaire sont souvent diagnostiqués sur la base d'éléments cliniques et lésionnels (Alloui & Sellami, 2015). Cependant, 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. L'ensemble des travaux de cette thèse sera présenté sous la forme d'un article publié. L'introduction bibliographique présentera une étude de la maladie ainsi que l'agent étiologique. Une discussion générale des résultats obtenus et une conclusion donneront sur des recommandations ainsi que de futures perspectives de recherche.

Présentation bibliographique

La bursite infectieuse aviaire (IBD pour Infectious Bursal Disease) est une infection virale, hautement contagieuse des jeunes poulets, espèce *Gallus gallus*. C'est l'une des maladies immunodépressives les plus importantes économiquement de la filière volaille (Etteradossi & Saif, 2013). L'agent étiologique de cette maladie est un Avibirnavirus de la famille des *Birnaviridae* nommé IBDV (pour Infectious Bursal Disease Virus). Deux sérotypes sont connus. Le sérotype 1 regroupe des souches de pathogénicité variable, parmi lesquelles on distingue les souches classiques, les souches variantes antigéniques et les souches hypervirulentes (vvIBDV). Les souches du sérotype 2 quant à elles, elles ne sont pas pathogènes.

1. Historique et évènements épidémiologiques majeurs

1.1. Apparition de la maladie et circulation des souches virales classiques

En 1957, une nouvelle entité clinique, très contagieuse, se disséminait rapidement dans les élevages de poulets dans la ville de Gumboro, située dans l'Etat du Delaware (Cosgrove, A.S., 1962).

Initialement, cette entité pathologique avait été décrite comme étant le syndrome néphrite-néphrose du poulet en raison des lésions rénales observées chez les poulets infectés. Par la suite la maladie est appelée « Maladie de Gumboro » d'après le nom de la ville où il y a eu la première épizootie (Cosgrove, A.S., 1962). Les premières études ont suggéré que l'agent étiologique était un coronavirus de la bronchite infectieuse aviaire à cause d'une similitude entre les lésions rénales observées dans les deux maladies (Winterfield & Hitchner, 1962). Cependant, des études ultérieures ont montré que des poulets vaccinés contre la bronchite infectieuse aviaire présentaient des lésions de bourse de Fabricius caractéristiques de la maladie de Gumboro confirmant que celles-ci étaient dues à un autre virus que le coronavirus (Winterfield *et al.*, 1978 ; Pejkovski *et al.*, 1979). L'isolement du virus de la maladie de Gumboro a été réalisé pour la première fois sur des œufs embryonnés de poulet (Winterfield *et al.*, 1962), et en raison des changements pathognomoniques observés au niveau de la bourse de Fabricius, Hitchner, 1970 avait proposé le nom de « Bursite Infectieuse Aviaire » à la maladie de Gumboro. Les souches virales d'IBDV pathogènes circulantes à cette époque sont dites « classiques » et elles ont diffusé largement dans la plupart des pays pratiquant une aviculture industrialisée (Etteradossi & Saif, 2013).

L'effet immunodépresseur de l'IBDV a été mis en évidence (Allan *et al.*, 1972) et l'existence d'un deuxième sérotype de l'IBDV (sérotype 2) a été isolé chez la dinde au moyen

Présentation bibliographique

de tests de séroneutralisation virale (McFerran *et al.*, 1980). Malgré son caractère infectieux et transmissible, le sérotype 2 est considéré comme non virulent chez la dinde et le poulet (McFerran *et al.*, 1980 ; Jackwood *et al.*, 1985 ; Jackwood *et al.*, 1987).

La forte prévalence de la maladie dans les élevages a rendu nécessaire de mettre en place des mesures rigoureuses de prévention et de contrôle de l'IBD.

1.2. Emergence des variants antigéniques

Jusqu'à 1984, les souches classiques de l'IBDV étaient efficacement contrôlées par les programmes de vaccination mis en place dans les élevages de volailles. Cependant, entre 1984 et 1985, des taux élevés de morbidité ainsi que des échecs de vaccination dus à l'IBD ont été signalés dans une zone à forte production de volailles dans la région de Delmarva aux USA (Rosenberger *et al.*, 1986). De nouvelles souches virales se sont révélées pathogènes dans des lots de poulets de chair vaccinés avec des vaccins issus de souches classiques. Ces nouveaux virus appelés « variants antigéniques » sont parvenus à échapper à l'immunité maternelle dirigée contre les souches classiques de l'IBDV, ayant ainsi un pouvoir pathogène chez les poulets infectés. Des tests de séroneutralisation virale ont révélé que les nouveaux variants étaient antigéniquement différents des souches d'IBDV virulentes classiques (Jackwood *et al.*, 1987). Ces souches variantes provoquent une atrophie rapide et une légère inflammation de la bourse de Fabricius chez des poulets Leghorns EOPS (Rosenberger *et al.*, 1987).

Ces virus continuent à circuler aux Etats-Unis (Jackwood *et al.*, 2016). D'autres génotypes variants ont été signalés en Amérique du Sud, au Canada, en Afrique du Sud, en Asie et en Europe (Cao *et al.*, 1998 ; Ikuta *et al.*, 2001 ; Domanska *et al.*, 2004 ; Jackwood *et al.*, 2007 ; Tomás *et al.*, 2015 ; Kurukulsuriya *et al.*, 2016 ; Yamazaki *et al.*, 2017).

Pour certains, (Domanska 2004, Tomás 2015), ces virus pourraient correspondre à des virus contemporains des virus classiques, qui n'auraient pas diffusé de la même façon que ces derniers mais n'auraient pas été totalement remplacés par les vvIBDV (Tomás *et al.*, 2015). Des variants antigéniques ont également été identifiés en Australie. On notera toutefois que les souches variantes australiennes sont elles aussi antigéniquement différentes des variants américains (Sapats & Ignjatovic, 2000).

Présentation bibliographique

1.3. Emergence des souches hypervirulentes ou « vvIBDV »

Entre 1987 et 1988, de nouvelles souches d'IBDV induisant une forte mortalité et un tableau clinique sévère ont émergé en Europe et se sont progressivement répandues dans le monde. Les premières souches de vvIBDV ont été signalées au Royaume-Uni. Elles ont été appelées souches hypervirulentes ou vvIBDV de l'anglais *very virulent IBDV*. Sur le plan antigénique, il existe quelques différences entre les souches vvIBDV et les souches IBDV classiques mais ces différences ne jouent aucun rôle dans le caractère hypervirulent des vvIBDV. Ces virus sont capables de franchir la barrière d'anticorps maternels qui protège normalement des souches classiques et d'induire entre 30 et 60% de mortalité dans les élevages de poulet : le caractère « hypervirulent » a initialement été employé pour décrire la mortalité, environ deux fois plus importante que celle observée pour les souches classiques (Chettle *et al.*, 1989 ; Van den berg *et al.*, 1991 ; Eterradossi *et al.*, 1992).

Plus récemment, une étude de chrono-phylogénie basée sur l'analyse des deux segments ARN double-brin de l'IBDV (segment A et segment B) a permis de présenter la plus probable hypothèse expliquant l'apparition des souches vvIBDV (Hon *et al.*, 2006). Dans ce rapport, l'émergence du segment A de type vvIBDV est survenue au moins 20 ans avant l'apparition des premières souches vvIBDV isolées en Europe, dans les années 1960. Ces résultats suggèrent que l'expansion des vvIBDV n'est pas directement liée à l'apparition du segment A vvIBDV et que de simples mutations ponctuelles sur ce segment ne peuvent être les seules raisons de l'augmentation de leur pouvoir pathogène. En revanche, l'apparition du segment B de type vvIBDV est estimée avoir eu lieu pendant les années 1980 et coïncide avec l'émergence des premières souches de vvIBDV. La non-conformité chrono-phylogénique des segments vvIBDV comparée aux autres souches de sérotype 1 suggère que l'émergence des vvIBDV pourrait être le fruit d'un réassortiment ayant conduit à associer ce type de segment B avec le segment A « de type vvIBDV » déjà présent dans les années 1980 (Figure 1).

Cependant, le faible nombre des souches d'IBDV collectées avant les années 80 empêche de vérifier avec certitude les hypothèses de chrono-phylogénie.

Certaines souches de vvIBDV ont subi des mutations ponctuelles dans le domaine hypervariable antigénique de la protéine de capsid, ce qui leur a conféré un profil antigénique particulier et certaines lignées caractéristiques d'un pays ont été identifiées comme en Egypte, en Chine, en Côte d'Ivoire et au Nigeria (Eterradossi *et al.*, 1997 ; Li *et al.*, 2015 ; Eterradossi *et al.*, 1999 ; Eterradossi *et al.*, 2004 ; Nwagbo *et al.*, 2016).

Présentation bibliographique

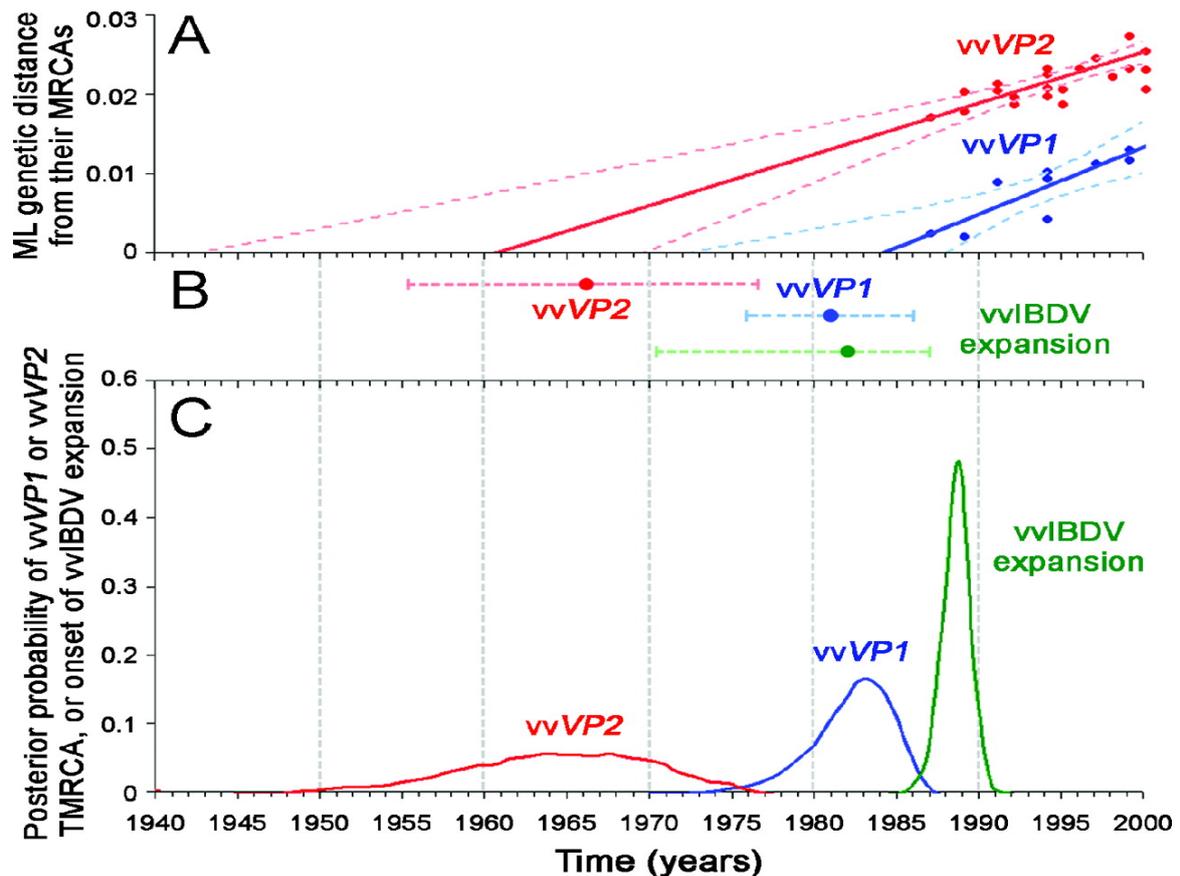


Figure 1 : Estimation de la date d'apparition (« Time of emergence of the most recent common ancestor », TMRCA) de chacun des deux segments A et B des vvIBDV et des premiers vvIBDV par différentes approches.

- (A) Estimation du TMRCA de vvVP2 (codée par le segment A) et de vvVP1 (codée par le segment B) avec une approche de régression linéaire.
- (B) Estimation du TMRCA de vvVP2 et vvVP1 ainsi que du début de l'expansion des vvIBDV par l'approche maximum de vraisemblance (ML)

Les lignes pointillées et les points pleins représentent respectivement les valeurs dans un intervalle de confiance de 95% et les meilleures valeurs.

- (C) Estimation TMRCA de vvVP2 et de vvVP1 ainsi que du début de l'expansion des vvIBDV par une approche bayésienne suivant le modèle de Monte Carlo-Chaîne de Markov (BMCMC).

L'estimation TMRCA de vvVP2 est effectuée par l'approche BMCMC à l'aide du programme « BEAST » (<http://evolve.zoo.ox.ac.uk/beast/>) à partir de séquences complètes et partielles de vvVP2. L'estimation TMRCA de vvVP1 est effectuée par l'approche BMCMC à l'aide du programme « MULTIDIVTIME » (<http://www.plant.ch>) et « BEAST » à partir de séquences entières de vvVP1 (Hon *et al.*, 2006).

Présentation bibliographique

2. Agent Etiologique de la maladie

2.1. Taxonomie

En raison de sa taille, l'IBDV a été classé dans un premier temps dans la famille des *Picornaviridae* (Cho *et al.*, 1969 ; Lunger *et al.*, 1972) puis dans la famille des *Reoviridae* à cause de sa ressemblance en microscopie électronique avec ces virus (Lukert *et al.*, 1974 ; Harkness *et al.*, 1975). Une similitude morphologique de l'IBDV avec le virus de la nécrose pancréatique infectieuse du saumon (IPNV : Infectious Pancreatic Necrosis Virus) a été rapportée pour la première fois par Almeida & Morris, 1973.

Depuis 1979, ce virus appartient à la famille des *Birnaviridae* (Dobos *et al.*, 1979 ; Müller *et al.*, 1979) qui regroupe 4 genres : *Aquabirnavirus* (représenté par le virus de la nécrose pancréatique infectieuse IPNV, *Avibirnavirus* (représenté uniquement par le virus de la bursite infectieuse aviaire qui infecte les oiseaux), *Entomobirnavirus* (représenté par le virus de la Drosophilla X ou DXV qui infecte les insectes), et *Blosnavirus* (représenté par le blotched snakehead virus BSNV qui infectent les poissons). Enfin, le virus de la nécrose du proventricule chez les poulets CPNV et d'autres virus qui infectent les mollusques comme le virus de la telline TV et le virus de l'huitre OV ont été classés dans la famille des *Birnaviridae* sans être encore assignés à un genre particulier (Guy *et al.*, 2011 ; Classification ICTV 2017). La relation taxonomique entre tous les virus de la famille des *Birnaviridae* est basée sur la morphologie, l'organisation du génome viral (ARN double brin) et la similitude entre les protéines de la capsid. Un test de séroneutralisation a permis cependant de distinguer les virus aquatiques de celui des insectes et du poulet (Dobos *et al.*, 1979 ; Guy *et al.*, 2011).

2.2. Morphologie

Le virus est non enveloppé et contrairement à la plupart des virus à ARNdb (ex : rotavirus, réovirus), il comprend une capsid icosahédrique monocouche. Il possède un diamètre de 60-70 nm (Figure 2).

Cette structure est de triangulation T=13 (Figure 3) (le nombre de triangulation correspondant au nombre d'unités identiques de capsid VP2 nécessaires pour constituer une unité asymétrique) et comprend 260 trimères de protéine de capsid VP2 (Hirai & Shimakura, 1974 ; Caston *et al.*, 2001 ; Chevalier *et al.*, 2005 ; Coulibaly *et al.*, 2005 ; Luque *et al.*, 2007).

Présentation bibliographique

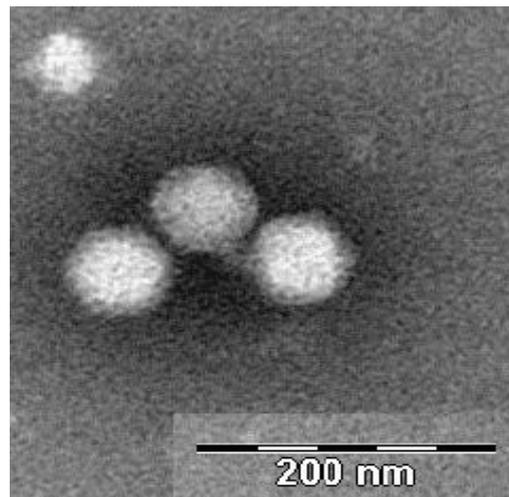


Figure 2 : Morphologie de particules virales d'IBDV observées en microscopie électronique à transmission après purification par gradient de Chlorure de Césium. Coloration à l'acide phosphotungstique (Photo ANSES Ploufragan).

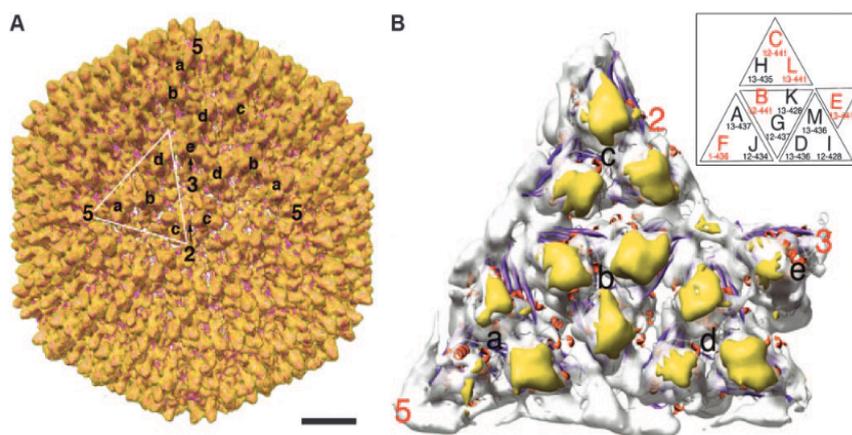


Figure 3: **A)** Modèle de capside d'IBDV d'ordre T=13, à 10Å de résolution. Les 5 types de trimères de VP2 sont indiqués par les lettres a à e. Le triangle blanc indique les limites d'un triangle qui contient 4 trimères de VP2 en contact quasi-équivalent. Les axes de symétrie 2, 3, et 5 sont indiqués. Echelle 100Å. **B)** Modèle représentant l'unité asymétrique de la capside d'IBDV à 13 VP2 (lettre A à M) qui est schématisé dans l'encadré. Les 5 types de trimères de VP2 sont indiqués par les lettres a à e (Schémas de Luque *et al.*, 2007).

Présentation bibliographique

Il a été déterminé par électro-microscopie que les sous-unités formant la capsid sont principalement des amas de trimères ; du fait de la conformation des sous-unités, la capsid acquiert une forme non sphérique (Böttcher *et al.*, 1997). Ce modèle de capsid icosaédrique T = 13 suggère que le virion est composé de 780 copies de protéine VP2 (Dobos *et al.*, 1979).

2.3. Propriétés physico-chimiques

Les particules virales obtenues par purification dans du CsCl₂ (Chlorure de césium) ont une densité variant de 1,32 à 1,33g/cm³ (Becht *et al.*, 1988). Les particules ayant une densité de 1,29g/cm³ à 1,31g/cm³ sont considérées comme incomplètes car elles contiennent une quantité variable d'acides nucléiques et présentent un pouvoir infectieux diminuée (Luque *et al.*, 2009a).

L'IBDV est un virus très stable et peut persister pendant plus de 60 jours dans les litières (Vendevogel *et al.*, 1976). Il peut résister à certains traitements chimiques et physiques. En effet, il résiste aux traitements au chloroforme et à l'éther, à l'incubation pendant 5h à 56°C et pH=2 mais est seulement inactivé à pH=12. Il résiste à l'exposition au phénol (0,5%) et au thimérosal (0,125%) pendant 1h à 30°C.

L'IBDV est détruit par des désinfectants tels que les dérivés chlorés, les aldéhydes (Benton *et al.*, 1967) et les savons inversés contenant 0,05% d'hydroxyde de sodium (Shirai *et al.*, 1994)

2.4. Composition génomique et protéique de l'IBDV

Le génome de l'IBDV est formé de deux segments d'ARN double brin (ARNdb) détecté lors d'électrophorèse en gel de polyacrylamide (Müller *et al.*, 1979 ; Jackwood *et al.*, 1984). Le segment A est d'une longueur d'environ 3,2 kpb et d'un poids moléculaire de 2,2.10⁶ Da et le segment B a une longueur d'environ 2,8 kpb et d'un poids moléculaire de 1,9.10⁶ Da (Hudson *et al.*, 1986 ; Müller *et al.*, 1987).

2.4.1. Les régions non codantes

Les deux segments génomiques A et B comprennent des régions dites non-codantes (NCR) localisées de part et d'autres des régions codantes. Les séquences de ces régions contiennent des signaux spécifiques pour la réplication de l'ARN, la transcription et la traduction (Kibenge *et al.*, 1996).

Les séquences complètes des régions non codantes 5' et 3' des segments A et B des souches IBDV nord américaines (SK140a, IN, OH) et des souches européennes (23/82, P2,

Présentation bibliographique

Cu-1, Cu-1M) ont été comparées (Kibenge *et al.*, 1996 ; Mündt et Müller, 1995). Les séquences NCR en 5' chez les deux segments sont composées d'un motif conservé de 32 nucléotides et qui pourrait correspondre à une région promotrice du virus (Kibenge *et al.*, 1996 ; Mündt & Müller, 1995 ; Nagarajan & Kibenge, 1997). Les NCR 3' des deux segments ne présentent aucune homologie entre elles (Figure 4), que ce soit au sein du sérotype 1 ou du sérotype 2. En revanche, les séquences des NCR 3' du segment A d'une part, ou du segment B d'autre part, sont parfaitement conservées au sein des différentes souches du sérotype 1 (Mündt et Müller, 1995).

Les NCR 5' et 3' des deux segments A et B révèlent des régions répétées et inversées (ITRs) : une ITR de 6 nucléotides de part et d'autre du segment A et deux ITRs de 7 et 12 nucléotides chacune, de part et d'autre du segment B. Ces régions sont susceptibles de contenir des signaux importants pour la réplication et la transcription de l'IBDV (Kibenge *et al.*, 1996 ; Boot & Pritz-Verschuren, 2004).

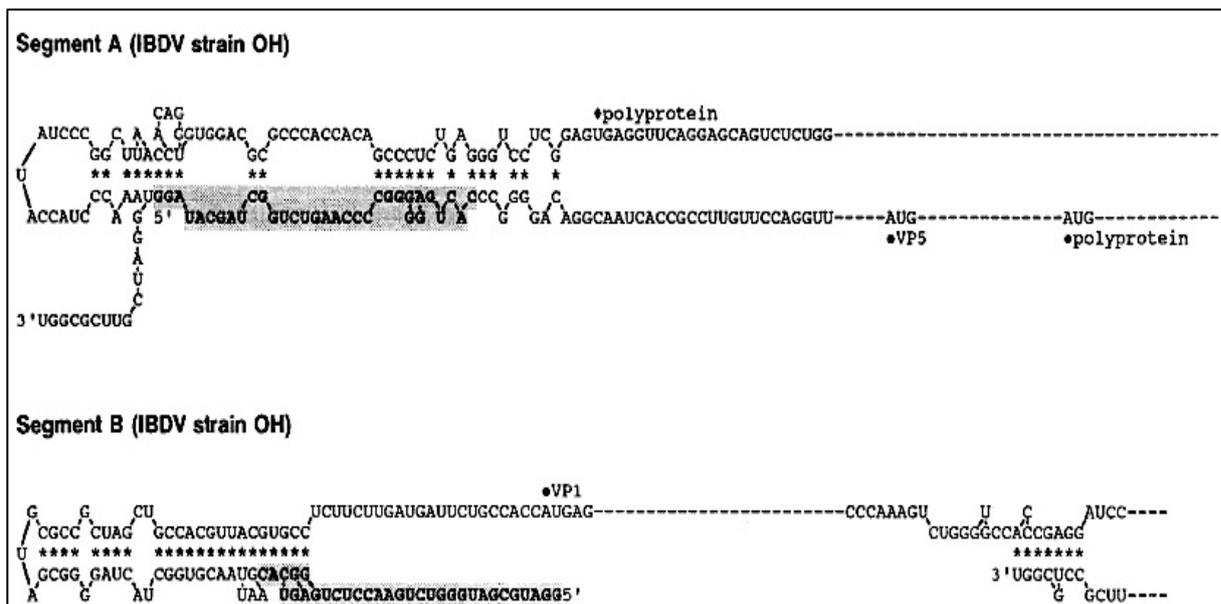


Figure 4 : Structures secondaires prédites d'ARN des séquences terminales des segments A et B de la souche IBDV (OH) qui appartient au sérotype 2.

(*): Désigne la liaison H. (-): indique de longues séquences.

La séquence NCR 5' de 32 nucléotides des brins d'ARN positifs dans les segments A et B est indiquée en gras et en grisé.

(♦) : Désigne le codon stop de la polyprotéine et (•) : désigne les codons d'initiation des ORF VP5 et de la polyprotéine sur le segment A et l'ORF VP1 sur le segment B (Kibenge *et al.*, 1996).

Présentation bibliographique

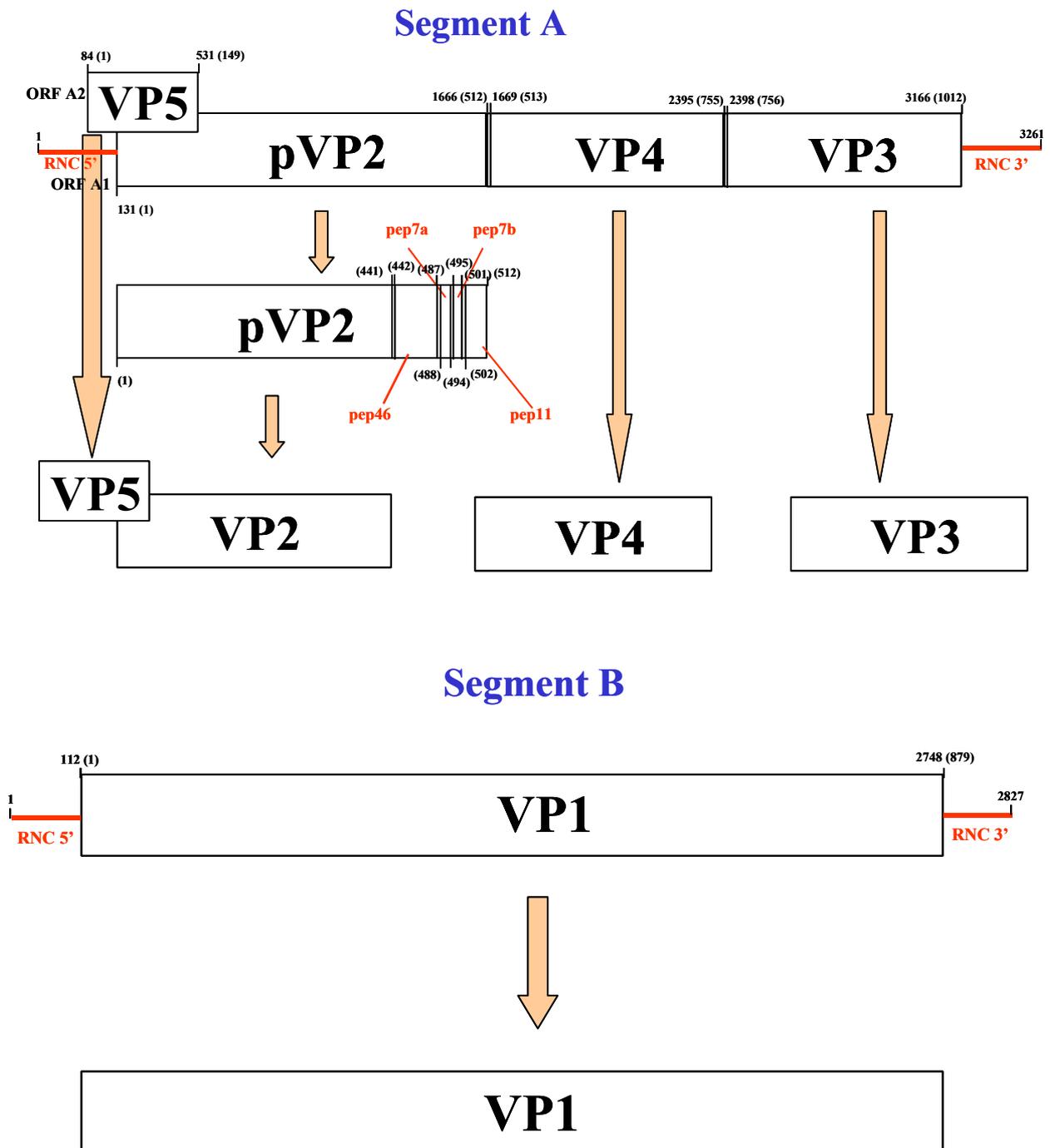


Figure 5: Représentation schématique des segments génomiques A et B et des protéines issues de ces segments. Les positions nucléotidiques et aminopeptidiques (entre parenthèse) sont indiquées par référence à la souche d'IBDV D6948 de sérotype 1 (Numéro d'accès dans les banques de données nucléotidiques correspondant à AF240686 et AF240687 pour respectivement le segment A et B). Schéma et légende d'après Le Nouën, 2006 (thèse).

Présentation bibliographique

2.4.2. Segment A

Le plus long segment A contient deux cadres de lecture ouverts ou ORF pour « open reading frames » (Spies *et al.*, 1989). Le plus grand ORF (ORF-A1) débute 47 nucléotides en aval du deuxième ORF (ORF-A2) (voir Figure 5).

L'ORF-A1 s'étend sur 3033 ou 3036 nucléotides pour les souches des sérotypes 1 et 2 respectivement (Boot *et al.*, 2000 ; Hudson *et al.*, 1986 ; Kibenge *et al.*, 1988). Il code pour une polyprotéine qui varie selon les souches entre 1011 et 1012 aa, (110 kDa) comprenant : le précurseur de la protéine de capsid pVP2 de 47 kDa qui est clivé en VP2 (41 kDa) et quatre peptides C-terminaux (pep46, pep7a, pep7b et pep11), la protéine VP3 de 31 kDa et la protéine VP4 de 28 kDa (Nick *et al.*, 1976 ; Dobos *et al.*, 1979 ; Jackwood *et al.*, 1984 ; Spies *et al.*, 1989).

L'autre cadre de lecture (ORF-A2) situé en amont de l'ORF-A1, est plus petit et chevauche partiellement le gène de la polyprotéine. Il code la protéine virale non structurale VP5 de 21 kDa, de 145 aa pour les souches classiques et supposée de 149 aa (soit 4 aa en plus en N-Terminal) pour les souches hypervirulentes (Kibenge *et al.*, 1990 ; Mundt et Müller, 1995 ; Boot *et al.*, 2000).

2.4.2.1. La protéine VP5

La VP5 est une protéine virale non structurale, riche en cystéine et hautement basique, dont les propriétés fonctionnelles ne sont pas encore parfaitement connues (Mundt *et al.*, 1995 ; Mundt. E, 1999).

Les études initiales ont montré que la VP5 est une protéine transmembranaire de classe II possédant une queue N-terminale intracellulaire et une région C-terminale extracellulaire qui se lie à la membrane plasmique. La région centrale de ce polypeptide (69 à 88 aa) serait composée d'une hélice transmembranaire hydrophobe. En outre, ces auteurs avancent que l'accumulation de VP5 dans la membrane plasmique peut faciliter la libération du virus (Lombardo *et al.*, 2000). Une étude plus récente remet en cause le caractère transmembranaire de VP5 et explique l'accumulation de VP5 à la membrane plasmique par la présence de domaines chargés positivement présents dans la région C-terminale de VP5, domaines qui permettraient à cette protéine de lier des lipides présents sur le feuillet interne de la membrane plasmique tels que le phosphatidylsérine ou le phosphatidylinositol et les phosphoinositides (Mendez *et al.*, 2015).

Présentation bibliographique

- Implication de la VP5 dans l'apoptose

Certaines publications soulignent le rôle que pourrait jouer la VP5 dans l'induction de l'apoptose lors d'une infection par l'IBDV, en interagissant avec le canal anionique mitochondrial voltage-dépendant de type 2 (VDAC2) (Li *et al.*, 2012 ; Lin *et al.*, 2015) et la sous unité régulatrice de la phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase (PI3K) (Wei *et al.*, 2011), deux protéines de la cellule hôte impliquée dans l'homéostasie cellulaire.

Cependant, d'autres travaux ont démontré que cette protéine VP5 est active avant même sa migration à la membrane en ayant un effet anti-apoptique dans un stade précoce de l'infection. En effet, elle est capable d'inhiber la fragmentation de l'ADN, l'activation des caspases 3 et 9 ainsi que le facteur nucléaire NF-kB responsables de l'induction de la mort cellulaire. Ces facteurs sont exprimés précocement et plus fortement lorsque le virus est déleté en VP5 (Liu et Vakharia, 2006). Enfin, l'implication potentielle de VP5 sur l'apoptose est en cours de discussion avec des rapports soutenant à la fois un rôle pro- et anti-apoptotique pour cette protéine.

- Implication de la VP5 dans la dissémination et la libération du virus

Très récemment, Mendéz *et al.* 2017 ont comparé la réplication de deux souches IBDV (WT et VP5-KO générés par génétique inverse). Le génome de la souche VP5-KO comporte une mutation ponctuelle responsable de l'élimination du site d'initiation de la traduction de la VP5 et WT est une souche non modifiée. Les résultats de cette étude ont démontré que l'absence de la VP5 n'avait pas un effet significatif sur la transcription/réplication de l'ARN viral, la traduction protéique, l'assemblage des particules virales et le titre viral intracellulaire. En revanche, la VP5 semble jouer un rôle dans la production de virus extracellulaires. En effet, les observations par microscopie électronique à transmission (TEM) ont révélé qu'une grande partie de particules virales nouvellement assemblées dans des cellules infectées par le virus WT étaient enfermées dans des vésicules membranaires. Ces vésicules exclusivement détectables dans les cellules infectées par le virus WT semblent faciliter la libération des particules virales des cellules possédant une membrane plasmique intacte. Ces résultats pourraient expliquer que l'IBDV comme d'autres virus non enveloppés utilise un mécanisme de libération de virus non lytique et selon ces résultats expérimentaux, ce mécanisme dépend de l'expression de la protéine VP5.

Présentation bibliographique

- Implication de la VP5 dans le pouvoir pathogène

Les souches virales mutantes n'exprimant pas la protéine VP5 de l'IBDV (souche vaccinale D78 et la souche réassortante Gx adaptée à la culture cellulaire) peuvent se répliquer (même si le titre infectieux maximal est significativement plus faible avec un retard dans leur niveau de réplication face aux virus non mutés) mais elles ne peuvent pas provoquer de lésions pathologiques ni de signes cliniques de la maladie (Qin *et al.*, 2010 ; Yao *et al.*, 1998). Ces travaux suggèrent que la protéine VP5 pourrait jouer un rôle dans la pathogénicité, cependant aucun marqueur n'a encore été identifié (Qin *et al.*, 2010).

Présentation bibliographique

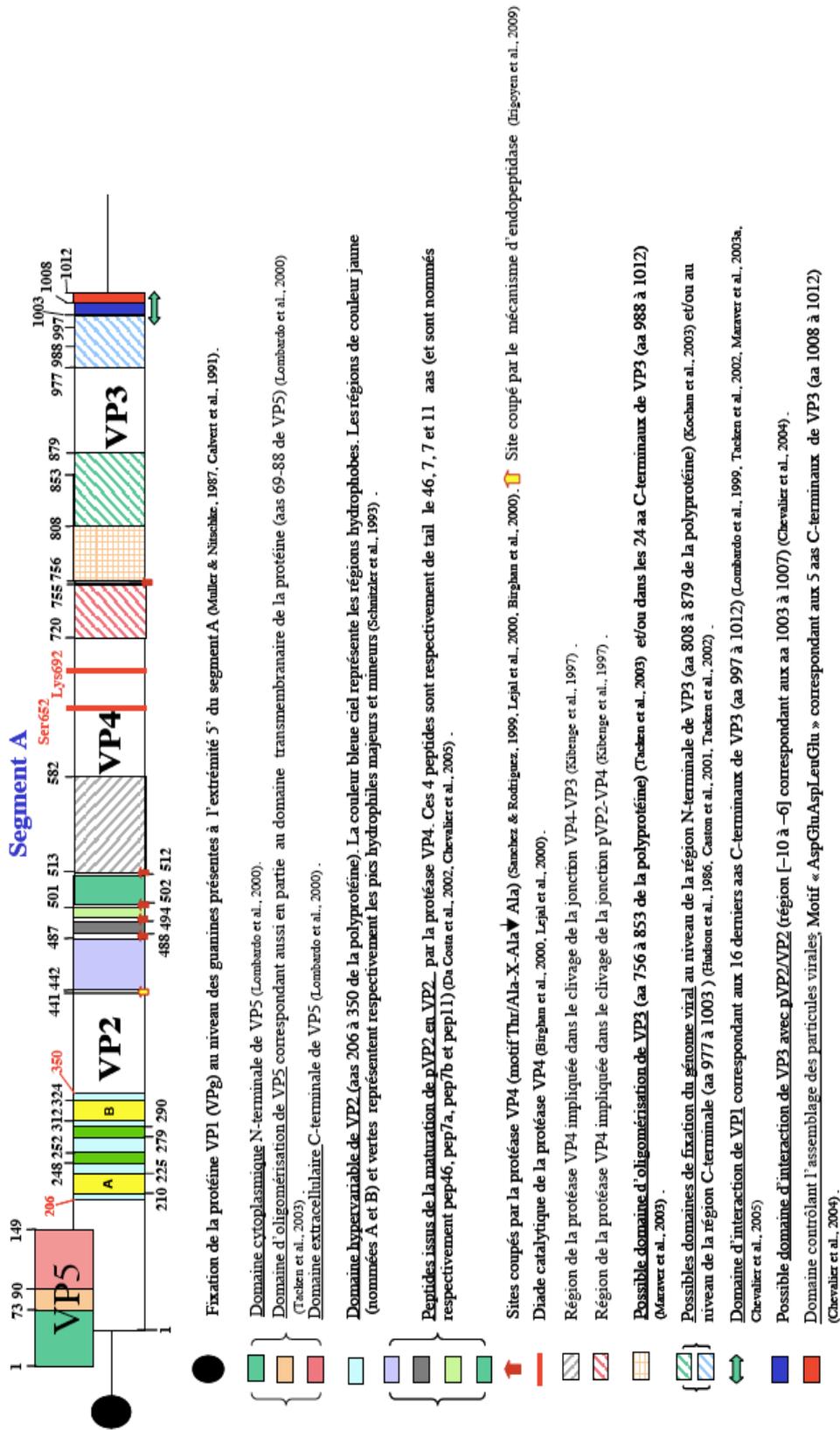


Figure 6 : Représentation schématique des protéines virales du segment A et des domaines fonctionnels connus pour chaque protéine (Thèse Escaffre, 2011)

Présentation bibliographique

In vitro, un virus recombinant de sérotype 1 (comprenant une VP5 et RNC 3' de sérotype 2) a présenté une diminution des effets cytopathique et apoptotique, une diminution du titre viral ainsi que l'absence des lésions histologiques de la BdF comparé à un virus de sérotype 1 non modifié. Aussi, la quantité de protéine virale VP2 exprimée entre ces deux virus n'a pas été significativement altérée (Schröder *et al.*, 2001).

2.4.2.2. La protéine VP2

La protéine VP2 est le seul constituant de la capsid virale (sous forme de trimères de VP2) et le seul antigène protecteur de l'hôte qui porte des épitopes dominants responsables de la production d'anticorps neutralisants (Azad *et al.*, 1987 ; Fahey *et al.*, 1989 ; Heine & Boyle, 1993 ; Coulibaly *et al.*, 2005). Elle est issue de la maturation de pVP2 suite au clivage de son extrémité C terminale par la protéine VP4 ainsi que par l'activité aminopeptidase de la protéase cellulaire Puromycin-sensible (Irigoyen *et al.*, 2012). Cette maturation libère 4 peptides notés pep46 (aa 442-487), pep7a (aa 488-494), pep7b (aa 495-501) et pep11 (aa 502-512) (Lejal *et al.*, 2000 ; Da Costa *et al.*, 2002), (Figure 6), mis en évidence à la surface de la particule virale de l'IBDV (Chevalier *et al.*, 2005).

- Implication de la VP2 dans l'antigénicité virale :

La protéine VP2 contient le domaine antigénique majeur, conformationnel et neutralisant entre les acides aminés 206 et 350 (Azad *et al.*, 1987 ; Bayliss *et al.*, 1990 ; Yamaguchi *et al.*, 1996). En outre, la plupart des modifications d'acides aminés observées entre les différentes souches d'IBDV, de même que celles liées à la variation antigénique, se concentrent dans ce domaine (Figure 7), appelé domaine variable ou région hypervariable (HVR, de l'anglais Hypervariable Region) (Hudson *et al.*, 1986; Bayliss *et al.*, 1990).

Plus récemment, la structure cristalline de la VP2 a révélé l'existence de trois domaines : la base (B), riche en hélices alpha, formée par les extrémités N et C terminales de la chaîne polypeptidique ; la coque (S) de l'anglais Shell, assurant le contact entre trimères et l'étanchéité de la particule virale ; et la protubérance (P) constituée de 5 boucles (Coulibaly *et al.*, 2005). La HVR se situe dans la protubérance et les boucles P_{BC} et P_{HI} coïncident avec les deux pics hydrophiles A et B où sont présents les épitopes spécifiquement reconnus par les anticorps monoclonaux neutralisants ; ainsi, les variations dans les séquences d'acides aminés présents dans ces régions peuvent entraîner des changements de réactivité contre les anticorps monoclonaux (Azad *et al.*, 1986 ; Schnitzler *et al.*, 1993 ; Eterradossi *et al.*, 1998 ; Letzel *et al.*, 2007).

Présentation bibliographique

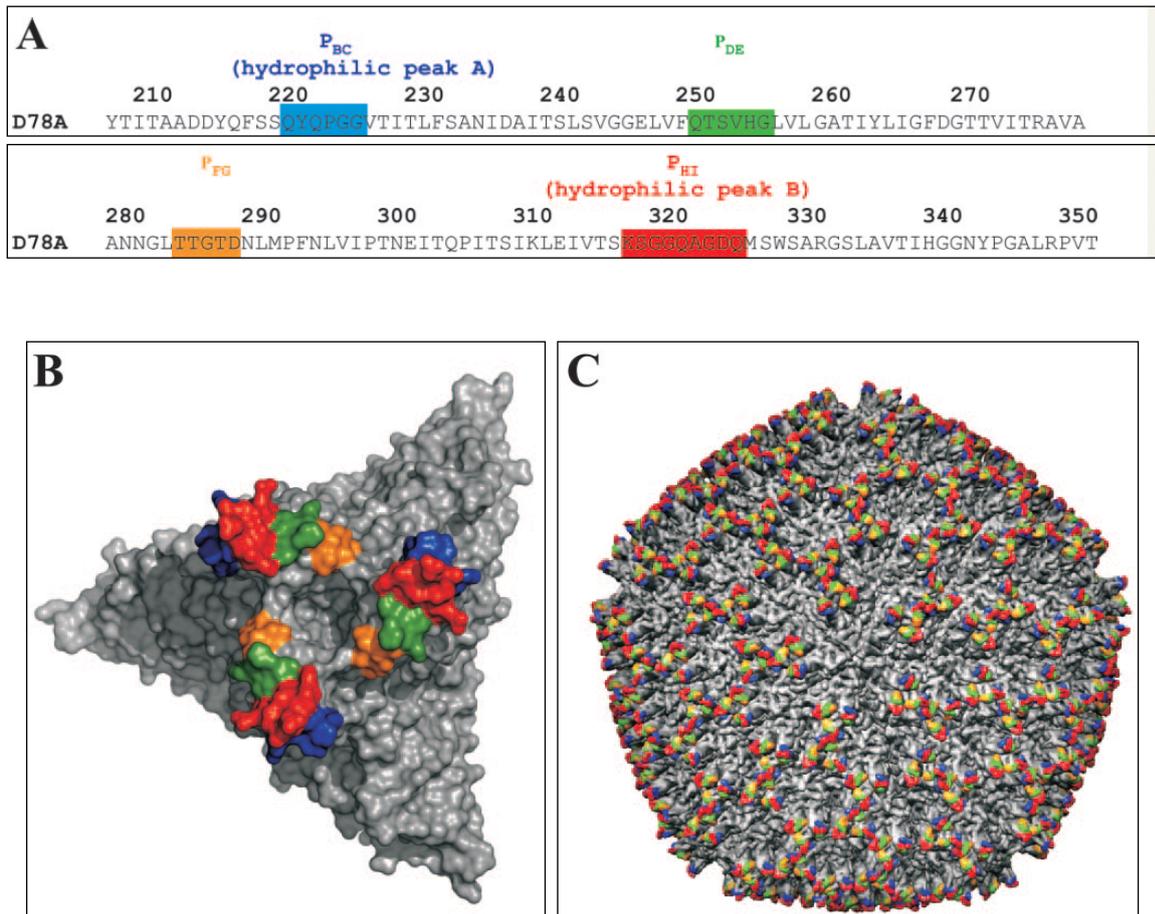


Figure 7: **A)** Positionnement des pics hydrophiles majeurs (A et B) et mineurs sur une séquence amino-peptidique de la protéine de capside VP2 de la souche D78A (Vakharia *et al.*, 1994). Ces 4 pics sont localisés au niveau des boucles du domaine P (P_{BC} , P_{DE} , P_{FG} , et P_{HI}) de chaque monomère de VP2 et sont impliqués dans l'antigénicité et dans la pathogénicité de l'IBDV. Les boucles P_{BC} , P_{DE} , P_{FG} , et P_{HI} sont représentées respectivement en bleu, vert, jaune et rouge. **B)** Représentation d'un trimère de VP2 exposant les boucles antigéniques du domaine P selon le code couleur présenté en A. **C)** Positionnement des boucles antigéniques de VP2 dans la structure T=13 d'une particule d'IBDV (Letzel *et al.*, 2007).

Présentation bibliographique

-Implication de la VP2 dans l'adaptation du virus à la culture cellulaire et dans le pouvoir pathogène

Il a été démontré par génétique inverse que les acides aminés présents dans les boucles P_{DE} et P_{FG} (Figure 8) les plus exposés au sommet du domaine (P) jouent un rôle important dans l'adaptation virale aux cultures cellulaires (Lim *et al.*, 1999 ; Mundt, 1999 ; Qi *et al.*, 2009) et dans la pathogénicité (Qi *et al.*, 2009 ; van Loon *et al.*, 2002). Ces deux boucles correspondant aux deux pics hydrophiles mineurs de la VP2 (aa : 248-253 et 279-290 respectivement). (Letzel *et al.*, 2007).

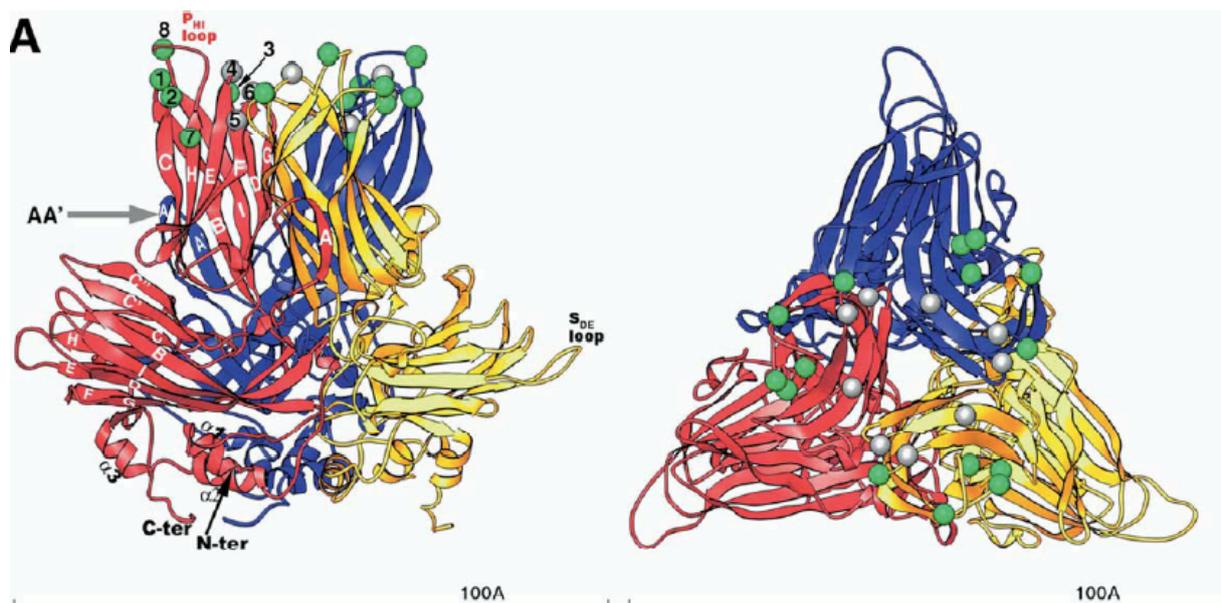


Figure 8 : Représentation d'un trimère de VP2 sous la forme d'un diagramme ruban (vue de gauche, de profil, vue de droite, vue de dessus). Les pics hydrophiles correspondent aux boucles reliant les feuillets B_{IDG} et C_{HEF} du domaine projeté P. Les boules vertes représentent le positionnement des aa responsables de l'antigénicité. Les boules grises représentent les aa responsables de l'adaptation du virus à la culture cellulaire et la virulence. Les différents numéros représentent les positionnements des aa suivants : 1, P222 et 2, G223 (localisés dans le domaine P_{BC}), 3, S251 et 4, H253 (localisés dans le domaine P_{BE}); 5, N279 et 6, T284 (localisés dans le domaine P_{FG}), 7, V313; 8, G322 (localisé dans le domaine P_{HI}). A noter que les boules grises se positionnent au centre et que les boules vertes se retrouvent tout autour de la protubérance (Coulibaly *et al.*, 2005).

Présentation bibliographique

En effet, la majorité des souches de sérotype 1 ne se multiplient pas sur culture cellulaire et nécessitent l'acquisition de mutations permettant l'adaptation à ces cultures, ce qui rend leur manipulation difficile. Plusieurs études ont été menées afin de déterminer les marqueurs de l'adaptation à la culture cellulaire des souches IBDV, des expériences de mutagenèse dirigée ont ainsi montré que les substitutions d'acides aminés 253Q→H et 284A→T sont responsables du phénotype atténué et de l'adaptation à la culture cellulaire (Van den Berg *et al.*, 1991 ; Mundt, 1999 ; Lim *et al.*, 1999 ; Brandt *et al.*, 2001). Des virus recombinants issus de souches hypervirulentes mais possédant les 2 aa (H253 et T284) responsables de l'adaptation à la culture cellulaire se sont révélés être significativement moins pathogènes (absence de morbidité, de mortalité et réduction des lésions histologiques de la BdF) que les copies moléculaires des virus sauvages dont ils sont issus. Ces mutations responsables de l'adaptation aux cultures cellulaires induisent donc une réduction du pouvoir pathogène (Raue *et al.*, 2004 ; van Loon *et al.*, 2002). Une mutation d'acide aminé en position 253 (H→Q/N) de la VP2 a augmenté considérablement la virulence d'une souche d'IBDV atténuée (Jackwood *et al.*, 2008). Néanmoins, le fait qu'une souche adaptée aux cultures cellulaires exprimant la VP2 de vvIBDV ne parvienne pas à induire un phénotype très virulent indique que la VP2 n'est pas le seul facteur déterminant en matière de virulence des vvIBDV (Boot *et al.*, 2000). Ainsi, tous ces marqueurs génétiques identifiés doivent cependant être appréhendés avec précaution, car il existe des exceptions. Par exemple, certaines souches peuvent contenir ces substitutions sans pour autant être très virulentes ; à l'inverse, d'autres souches ne présentent pas ces substitutions peuvent avoir un phénotype très virulent (Eterradossi *et al.*, 1997 ; Le Nouen *et al.*, 2006).

- Implication de la VP2 dans le mécanisme de l'apoptose

Il a été rapporté que la VP2 pouvait induire l'apoptose sur des cultures cellulaires de mammifères mais pas sur des cultures cellulaires issues d'œufs embryonnés EOPS (Fernandez-Arias *et al.*, 1997, Shin *et al.*, 2014). Des études expérimentales ont démontré que l'expression de VP2, à l'aide de virus de la vaccine ou de vecteurs plasmidiques, arrête la synthèse des protéines cellulaires puis l'apoptose, ce qui peut être neutralisé par la surexpression de Bcl-2. Ce phénomène serait dû à l'activation de la PKR (Protein Kinase-R) (Fernandez-Arias *et al.*, 1997, Busnadiago *et al.*, 2012).

Plus récemment, il a été démontré que la protéine VP2 interagit avec l'ORAOV 1 (oral cancer overexpressed 1), une oncoprotéine potentielle. L'infection par l'IBDV ou l'expression de la VP2 provoque une réduction de l'expression de l'ORAOV1 cellulaire et

Présentation bibliographique

l'induction de l'apoptose. En revanche, une surexpression d'ORAOV1 conduit à l'inhibition de l'apoptose induite par la VP2 associée à une diminution significative de la libération virale. Ainsi, l'apoptose induite par la VP2 pendant l'infection par l'IBDV semble être médiée par l'interaction avec la réduction d'ORAOV1, une protéine qui semble agir comme une molécule anti-apoptotique et limite la libération virale au début de l'infection par l'IBDV (Qin *et al.*, 2017). Cependant, le mécanisme exact utilisé par la VP2 dans l'induction de l'apoptose reste inconnu.

2.4.2.3. La protéine VP3

C'est une protéine multitâche, capable d'assurer plusieurs fonctions, apparemment non liées entre elles (Luque *et al.*, 2009b). La partie C-terminale de la protéine VP3 est hautement hydrophile et contient une région riche en proline et en acides aminés chargés. Ces caractéristiques biochimiques favorisent les interactions avec des protéines et des acides nucléiques (Casanas *et al.*, 2008).

La protéine VP3 contient à la fois des épitopes indépendants de la conformation, spécifiques au groupe (communs aux deux sérotypes) et des épitopes spécifiques du sérotype (Mahardika & Becht, 1995 ; Casañas *et al.*, 2008) qui provoquent la production d'anticorps non neutralisants et non protecteurs lors d'infection des poulets. Elle interagit avec la protéine VP1 pour renforcer l'efficacité de l'encapsidation (Lombrado *et al.*, 1999 ; Tacken *et al.*, 2000).

Certaines études ont mis en évidence une fonction d'échafaudage de la région C terminale de la protéine VP3, région essentiellement impliquée dans la régulation de l'assemblage de la capsidie par des interactions avec le polypeptide pVP2 et la protéine VP1, ainsi que dans la stabilisation des deux segments d'ARNdb (Chevalier *et al.*, 2004 ; Da Costa *et al.*, 2002 ; Maraver *et al.*, 2003 ; Ona *et al.*, 2003).

D'autres études ont par ailleurs démontré que l'extrémité C-terminale de la protéine VP3 joue le rôle d'activateur de transcription de la VP1 en induisant sur la VP1 un changement conformationnel qui élimine un blocage structurel inhérent du site actif de la RdRp (Garriga *et al.*, 2007). Enfin, la protéine VP3 intervient dans le recrutement de la VP1 dans la capsidie, au moyen d'interactions protéiques qui forment des complexes ribonucléoprotéiques (Luque *et al.*, 2009b).

Présentation bibliographique

2.4.2.4. La protéine VP4

C'est une protéine non structurale qui joue le rôle de protéase virale et serait donc responsable du clivage de la polyprotéine (Jagadish *et al.*, 1988 ; Chevalier *et al.*, 2002). Elle est capable de former des tubules à l'intérieur des cellules infectées (Granzow *et al.*, 1997).

La position exacte du clivage entre VP3 et VP4 est le site MAA situé entre les résidus 754 et 756. Le site LAA, constitué par les acides aminés en position 511 à 513 est le lieu de clivage entre VP4 et le précurseur pVP2 (Sanchez & Rodriguez, 1999). Les 70 aa N-Ter de la protéase sont essentiels au clivage de la liaison VP4-VP3 alors que les 36 aa de la partie C-Ter sont quant à eux impliqués dans le clivage pVP2-VP4 (Kibenge *et al.*, 1997). Le site actif de la protéase virale a été déterminé et comprend les aa Ser-652 et Lys-692 situés dans la partie C terminale de VP4 (Lejal *et al.*, 2000 ; Birghan *et al.*, 2000).

Ces deux résidus sont essentiels pour l'activité protéolytique de VP4 puisque leur suppression abolit complètement l'activité de la protéase et ne permet plus le clivage de la polyprotéine en pVP2, VP4 et VP3 (Sanchez & Rodriguez, 1999 ; Lejal *et al.*, 2000 ; Birghan *et al.*, 2000).

Par des expériences de délétion dans VP4, ses 70 aa dans la région N terminale ont été démontrés comme étant essentiels au clivage de la jonction VP4-VP3 et ses 36 aa dans la région C terminale comme indispensables au clivage de pVP2-VP4 (Kibenge *et al.*, 1997). Ces régions N- et C-terminales de la protéase VP4 sont respectivement conservées à 99% et 100% entre les différentes souches d'IBDV (Lana *et al.*, 1992). La mutation d'une seule des positions 652 ou 692 dans la polyprotéine exprimée en système baculovirus inhibe la libération de pVP2, VP4 et VP3, démontrant ainsi l'importance des deux acides aminés catalytiques (Birghan *et al.*, 2000 ; Lejal *et al.*, 2000).

Des travaux ont suggéré que la VP4 jouait un rôle dans l'inhibition de l'expression des interférons de type I en agissant sur l'activité d'ubiquitylation d'un facteur pro-inflammatoire, le GILZ (pour glucocorticoid-induced leucine zipper), dévoilant un nouveau mécanisme employé par l'IBDV pour supprimer la réponse immunitaire de l'hôte (Li *et al.*, 2013 ; He *et al.*, 2017).

Enfin, VP4 serait capable de transactiver la synthèse de VP1. En effet, l'inhibition de l'activité de VP4 par des mutations inactivantes entraîne une inhibition de la synthèse de VP1 (Birghan *et al.*, 2000).

Présentation bibliographique

2.4.3. Le segment B

Le plus court segment génomique B ne contient qu'un seul ORF qui code pour la protéine VP1 (Figure 9), l'ARN polymérase ARN dépendante (95 kDa) qui assure la réplication et la transcription (synthèse de l'ARNm) du génome viral. La protéine VP1 est présente en faible quantité dans le virion et comporte un motif conservé retrouvé dans toutes les ARN-polymérases (Duncan *et al.*, 1991 ; Dobos *et al.*, 1995). Elle ne représente que 3% en masse des protéines virales. Elle est présente dans le virion sous forme libre ou liée par liaison covalente aux extrémités 5' des deux segments du génome (Von Einem *et al.*, 2004 ; Pan *et al.*, 2007).

La forme liée, notée VPg de l'anglais Viral Genome-linked Protein, est associée aux extrémités 5' du génome bisegmenté en formant une structure en « manche de casserole » ce qui est supposé protéger l'ARN de la dégradation par les ribonucléases (Müller *et al.*, 1979). Cette liaison ainsi qu'une association entre VPg permet à chacun des deux segments génomiques de s'unir en cercle pour former une structure en anneau (Müller et Nitchke, 1987 ; Tacken *et al.*, 2000 ; Tacken *et al.*, 2003). La forme libre de VP1 et celle qui porte l'activité ARN-polymérase ARN-dépendante (RdRp). Elle a une activité guananyl-transférase et méthyl-transférase, impliquée dans le masquage des copies d'ARN lors de la réplication virale (Morgan *et al.*, 1988 ; Spies *et al.*, 1989).

La protéine VP1 comprend trois régions fonctionnelles : l'extrémité N-terminale (aa 1 à 167), le domaine central de la polymérase (aa 168 à 658) et l'extrémité C-terminale (aa 659 à 878). Le domaine central contient tous les motifs structuraux de la RdRp (Garriga *et al.*, 2007 ; Pan *et al.*, 2007). Figure 5. L'extrémité N-terminale de VP1 est impliquée dans l'amorçage protéique car elle possède le site de guanylation putatif (Xu *et al.*, 2004, Pan *et al.*, 2007). Le domaine central de la polymérase se replie en une structure en forme de main droite et comporte des sous domaines appelés « doigts », « paume » et « pouce ». Les cinq motifs typiques de l'ARN polymérase (C, A, B, D et E) sont situés dans la région « paume » de la polymérase. Chacun des motifs aa assure une fonction pendant la réplication virale, par exemple, dans la reconnaissance et la liaison nucléotidique (les motifs A, B et F), le transfert de groupes phosphoryle (A & C), la liaison avec un ion métallique Mn^{2+} et Mg^{2+} pour assurer la catalyse (C), le guidage des nucléotides vers les sites actifs (D) et la préhension des nucléotides (E) (Pan *et al.*, 2007). Le motif C forme le site actif de la polymérase (Shwed *et al.*, 2002, Pan *et al.*, 2007). Les sous-domaines des doigts contiennent des motifs de polymérase F et G qui sont impliqués dans la réplication du virus (Pan *et al.*, 2007).

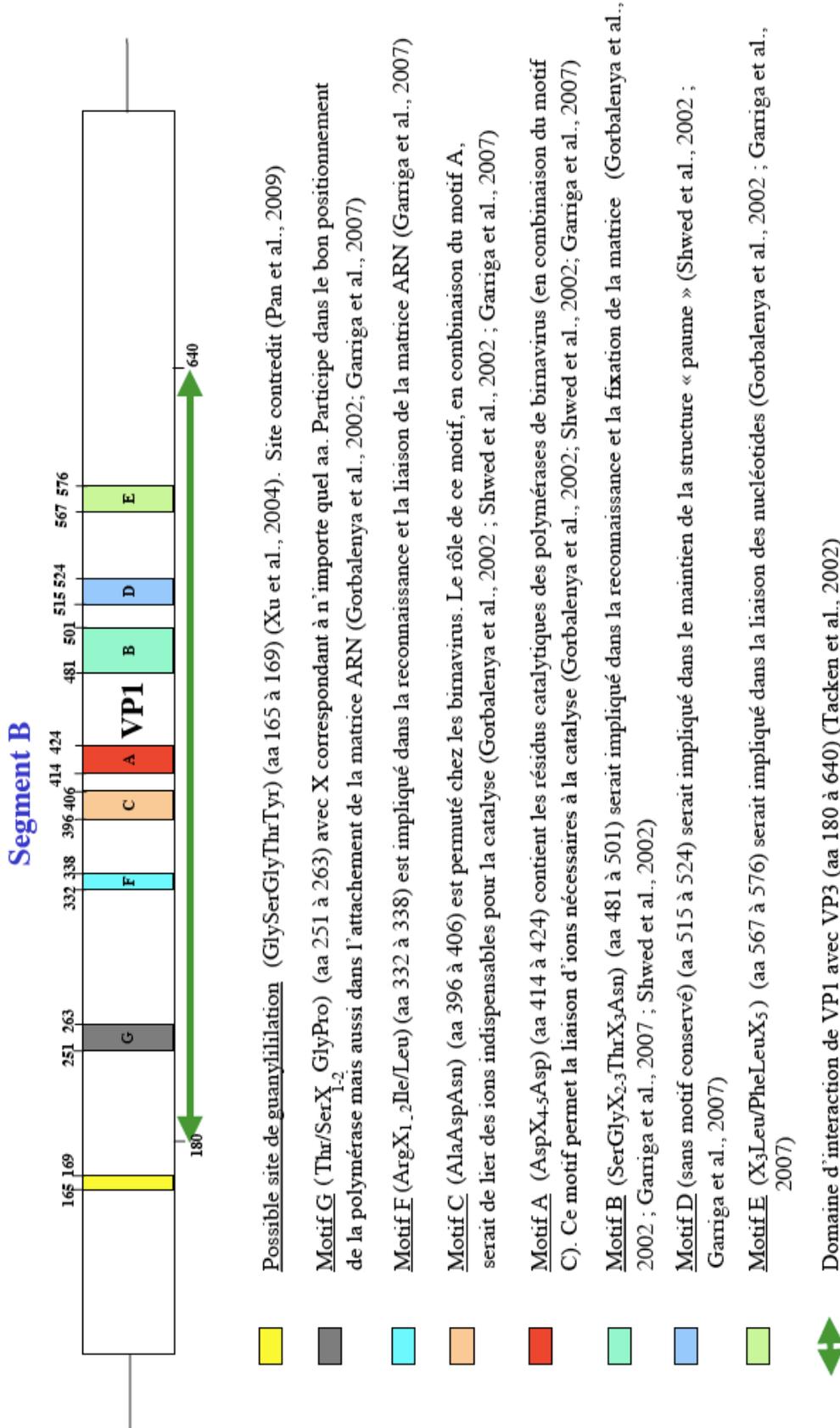


Figure 9 : Représentation schématique de la protéine virale VP1 du segment B et des motifs connus ou suspectés pour cette protéine (Escaffre, Thèse 2011)

Présentation bibliographique

- Rôle du segment B dans le pouvoir pathogène de l'IBDV

La comparaison des séquences des segments B de différentes souches d'IBDV ayant un pouvoir pathogène varié a révélé la présence de différences amino-peptidiques. Selon plusieurs études sur des virus réassortis contenant des segments dérivés de souches vvIBDV ou atténuées, la VP1 contribue également au caractère phénotypique des souches IBDV (Boot *et al.*, 2004 ; Liu et Vakharia, 2004 ; Le Nouën *et al.*, 2012).

D'après certaines études, différentes positions d'acides aminés de la VP1 seraient impliquées dans le renforcement du pouvoir pathogène. Ainsi, Yu *et al.* 2013 ont démontré qu'une seule substitution d'aa dans le domaine N terminal de la VP1 (4V→I) renforce l'activité polymérase dans les cultures cellulaires et atténue la pathogénicité *in vivo* de la souche vvIBDV chinoise « HLJ0504 ». En outre, Escaffre *et al.* 2013 ont découvert que la substitution d'aa (276A→T) est responsable de l'atténuation du pouvoir pathogène d'une souche IBDV apparentée génétiquement aux souches vvIBDV mais qui présente une antigénicité et une pathogénicité atypiques.

- Implication de la VP1 dans le niveau de réplication virale

L'observation de différences dans l'efficacité de réplication de souches d'IBDV réassortantes (générées par génétique inverse ou isolées dans la nature) suggère que différents segments B pourraient moduler l'efficacité de réplication :

Un virus comportant un segment A de vvIBDV doté des mutations d'adaptations à la culture cellulaire (Q253H, A284T) et un segment B d'une souche vaccinale adaptée à la culture cellulaire possède un titre infectieux sur CEF 100 à 1000 fois plus important que le même virus mais doté d'un segment B provenant d'un vvIBDV (Boot *et al.*, 2005). A l'inverse, un virus comportant un segment A d'un virus vaccinal adapté à la culture cellulaire avec un segment B provenant d'un vvIBDV présente une profonde diminution du niveau de réplication sur CEF face au même virus mais doté du segment B de souche vaccinale adaptée à la culture cellulaire (Boot *et al.*, 2005). Cette caractéristique a été également rapportée sur CEF avec des virus réassortants naturels isolés en Chine (Wei *et al.*, 2006, 2008). Il semble donc que pour une réplication optimale en culture cellulaire, un segment B dérivé d'un virus adapté à ce support soit un élément important, voire plus important qu'une origine phylogénétique commune (potentiellement garante d'une bonne compatibilité) des segments A et B.

Cette conclusion pourrait même être étendue à la réplication *in-vivo* : A 3 jours p.i, un virus variant US (GLS) adapté à la culture cellulaire (mutations Q253H, A284T sur le

Présentation bibliographique

segment A) démontre une efficacité de réplication dans la BF supérieure lorsque son segment B est dérivé de la même souche propagée *in-vivo*, par comparaison avec un segment B dérivé de la même souche mais propagée de façon sériée en culture cellulaire (Liu & Vakharia, 2004). Le séquençage du segment B de GLS, avant et après adaptation à la culture cellulaire

2.5. Cycle répliatif de l'IBDV

La durée du cycle répliatif de l'IBDV sur des lignées cellulaires de fibroblastes (DF1) ou de lymphocytes B (DT40) est de 10 à 36 heures, avec une période de latence de 4 à 6 heures (Lukert et Davis, 1974 ; Jackwood *et al.*, 1984 ; Luo *et al.*, 2009 ; Wang *et al.*, 2009). Sur des lignées cellulaires telles que les cellules Véro ou BGM-70, ce temps est allongé à environ 48h (Lukert *et al.*, 1975 ; Jackwood *et al.*, 1987 ; Kibenge *et al.*, 1988). La synthèse de polypeptides spécifiques de l'IBDV dans des cultures primaires de lymphocytes B issues de BdF se fait 90 min après l'infection et des particules virales ont été détectées dans le milieu de cette culture cellulaire 6 h après infection (Müller & Becht, 1982).

Enfin, des brins positifs ainsi que des brins négatifs des deux segments (B+, A+, B-, A-) ont été détectés respectivement à 2, 4, 6 et 8 heures après infection dans des cultures de fibroblastes primaires (CEF) (Escaffre *et al.*, 2010).

2.5.1. Attachement et entrée cellulaire

Comme tous les virus non enveloppés et dépourvus de membrane externe, l'IBDV est incapable d'effectuer une fusion membranaire pour entrer dans la cellule cible (Moyer & Nemerow, 2011). Le mécanisme exact de l'invasion cellulaire par l'IBDV n'est toujours pas entièrement clair. La première étape d'infection par l'IBDV est la fixation de la particule virale à sa cible grâce à la reconnaissance d'un récepteur membranaire spécifique. Il a été démontré que plusieurs protéines de surface cellulaire étaient impliquées dans l'invasion cellulaire par l'IBDV. Ces protéines se lient spécifiquement à la VP2 de l'IBDV, la composante majeure de la capsid (Qin & Zheng, 2017).

Il existe des différences entre les souches du sérotype 1 et les souches du sérotype 2. En effet, seules les souches du sérotype 1 se répliquent dans les lymphocytes de poulets. Les souches du sérotype 2 se fixent mais ne rentrent pas dans les lymphocytes. Elles sont donc incapables de s'y répliquer (Nieper et Müller, 1996 ; Soubies *et al.*, 2017). La cellule cible des souches du sérotype 2 est encore inconnue.

Les souches de sérotype 1 de l'IBDV possèdent un tropisme sélectif pour les lymphocytes B portant l'immunoglobuline M de surface (sIgM, de l'anglais *Surface*

Présentation bibliographique

Immunoglobulin M) ; l'internalisation est déclenchée par la liaison spécifique de la VP2 aux récepteurs cellulaires correspondants (Hirai et Calnek, 1979 ; Ogawa *et al.*, 1998 ; Luo *et al.*, 2010).

Les premières études menées à ce sujet ont conclu qu'une ou des protéines N-glycosylées des lymphocytes B portant la sIgM pouvaient être la molécule d'attachement des souches IBDV virulentes (Ogawa *et al.*, 1998).

Selon une étude plus récente, la protéine de choc thermique 90 du poulet (cHsp90, de l'anglais chicken heat shock protein 90) retrouvée sur la surface membranaire des cellules DF1 a été identifiée comme impliquée dans l'interaction avec une souche de sérotype 1 adaptée à la culture cellulaire. L'utilisation d'un anticorps contre cette protéine inhibait l'infection par l'IBDV et son expression dans les cellules normalement non permissives permettait de les rendre sensibles à l'infection (Lin *et al.*, 2007).

D'autre part, un triplet d'aa « Ile-Asp-Ala » (IDA) au niveau du domaine (P) de la protéine VP2 (aa 234 à 236) a été identifié en tant que motif similaire à celui permettant à la fibronectine de lier l'intégrine $\alpha 4\beta 1$, un récepteur cellulaire d'adhésion impliqué dans les interactions cellule-cellule (Delgui *et al.*, 2009). L'hétérodimère $\alpha 4\beta 1$ est très abondant dans les lymphocytes B immatures (Rose *et al.*, 2002) ce qui serait en concordance avec la sensibilité des jeunes oiseaux aux infections par l'IBDV (Qin & Zheng, 2017). Une étude similaire à celle de Delgui et al. 2009 mais en utilisant d'autres souches de sérotype 1 permettrait de vérifier si toutes les souches de sérotype 1 utilisent le même récepteur cellulaire.

Les interactions entre les particules virales IBDV et l'intégrine $\alpha 4\beta 1$ permettraient l'adsorption du virus sur la cellule, étape qui pourrait être suivie d'interactions avec la protéine cHsp90, mais aussi certainement avec d'autres polypeptides cellulaires (Delgui *et al.*, 2009). La liaison IBDV- $\alpha 4\beta 1$ entraîne la phosphorylation de c-Src, qui active la cascade de réarrangement Akt-RhoA-actine pour l'internalisation endocytaire de l'IBDV (Ye *et al.*, 2016). Le rôle crucial du réarrangement de l'actine dans l'internalisation de l'IBDV peut également être mis en évidence par la découverte que l'entrée d'IBDV impliquait la macropinocytose et le trafic vers les endosomes précoces d'une manière dépendante de Rab5 (Gimenez *et al.*, 2015). Cependant, il y a encore beaucoup de travail pour élucider le rôle exact de l'interaction VP2- $\alpha 4\beta 1$ dans l'entrée IBDV.

Enfin, d'autres études doivent être menées pour comprendre le rôle exact jouer par l'interaction VP2-intégrine $\alpha 4\beta 1$ pour l'entrée de l'IBDV dans la cellule.

Présentation bibliographique

La perforation de la membrane cellulaire et l'altération structurales des protéines de surfaces sont des stratégies utilisées par des virus non enveloppés pour traverser les membranes cellulaires (Moyer & Nemerow, 2011) mais le mécanisme d'entrée cellulaire exact utilisé par l'IBDV est encore mal connu.

Il semble que pep46, un peptide issu de la maturation de la protéine de capsid VP2, présent à la surface du virus, aurait une activité de perméabilisation membranaire qui déstabiliserait la membrane endosomique en formant des pores (Galloux *et al.*, 2007).

Le virus est endocyté en présence de calcium (Yip *et al.*, 2012). Ensuite la faible concentration en calcium de l'endosome permet au pep46 d'être libéré par les particules virales. Par ailleurs, la formation de pores membranaires requiert une concentration minimale de pep46, qui semble se positionner de façon parallèle à l'interface lipide/eau puis s'insère dans la membrane lipidique en écartant les pôles hydrophiles des phospholipides membranaires (Galloux *et al.*, 2010).

2.5.2. Réplication et traduction virale

L'IBDV code pour sa propre polymérase virale (la protéine VP1) qui reste active sans protéolyse préalable ou une dégradation de la capsid virale. L'IBDV peut donc directement initier sa réplication dès l'entrée dans la cellule sans nécessiter l'exposition de son génome ARN au cytoplasme cellulaire (Spies *et al.*, 1987). Ce n'est pas le cas d'autres virus à ARN bicaténaire (comme les réovirus) qui doivent subir une partielle décapsidation, nécessaire à l'activation de leurs ARN-polymérase, avant de commencer la réplication et la transcription (Skehel et Joklik, 1969).

Selon Luque *et al.* 2009b, la transcription de l'ARN de l'IBDV se produirait à l'intérieur de complexes ribonucléoprotéiques (RNP). Le modèle proposé (Figure 10) est le suivant : les RNP de l'IBDV sont exportés à travers les pores des endosomes, puis, grâce à l'adressage membranaire de la VP3, ils se fixent sur la membrane limitante de ces organites, où la réplication du génome viral a lieu. Les RNP liés aux vésicules endocytaires peuvent ensuite se déplacer le long de microtubules, jusqu'à atteindre la région périnucléaire. Une fois que les RNP ont atteint cette région et sont entrés en contact physique avec l'appareil de Golgi, la réplication virale commence et l'assemblage viral a lieu (Delgui *et al.*, 2013).

La RdRp VP1 des birnavirus amorce la synthèse de l'ARN par un mécanisme d'amorce protéique sans matrice (Müller et Nitschke, 1987). D'après différentes études, la synthèse de l'ARN de l'IBDV s'effectue selon un mécanisme de « copy-back », dans lequel l'extrémité 3' de la matrice amorce la synthèse du brin anti-sens en se repliant pour former

Présentation bibliographique

une épingle à cheveux d'ARN (Von Einem *et al.*, 2004 ; Pan *et al.*, 2007). Certains auteurs avancent que pendant la transcription, les transcrits nouvellement synthétisés sont exportés dans le cytoplasme à travers les pores de la capsid virale, ou ils sont traduits (Coulibaly *et al.*, 2005).

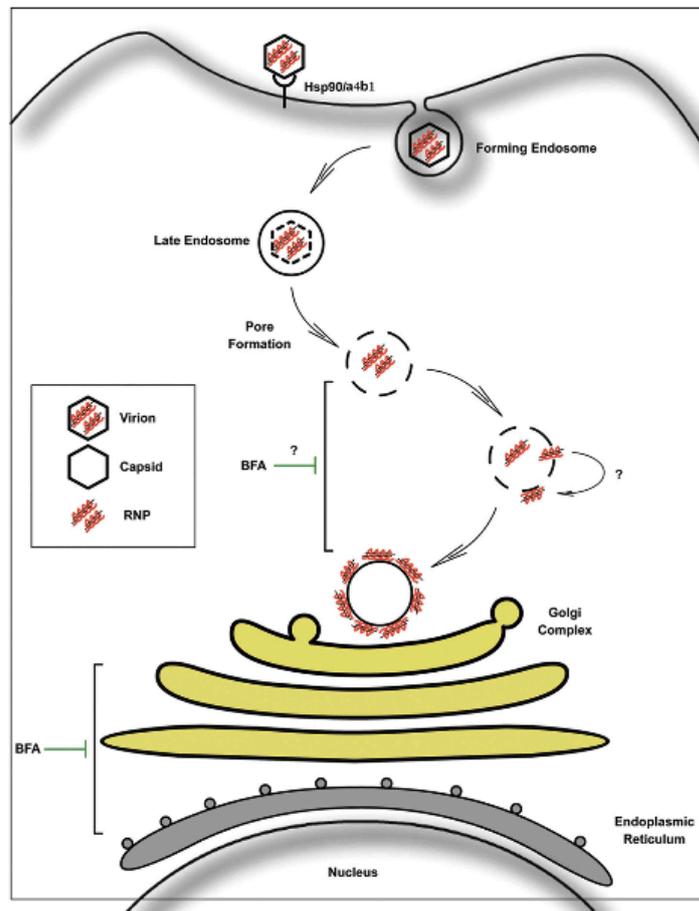


Figure 10 : Schéma représentant un modèle proposé pour la transcription de l'IBDV (Delgui *et al.*, 2013)

2.5.3. Assemblage des protéines virales

La plupart des protéines virales interviennent dans le modèle d'assemblage de l'IBDV. Le polypeptide VP3 interagit avec la pVP2, la VP1 et le génome viral et joue un rôle clé dans la régulation des processus de morphogénèse et d'encapsidation (Lombardo *et al.*, 1999 ; Tacken *et al.*, 2002 ; Chevalier *et al.*, 2002 ; Chevalier *et al.*, 2004). La protéine de capsid est synthétisée sous la forme d'un précurseur, pVP2, et sa maturation passe par des étapes protéolytiques régulées par des protéases du virus et de l'hôte, outre la participation d'une

Présentation bibliographique

protéine d'échafaudage (Irigoyen *et al.*, 2012). Comme indiqué dans le chapitre plus haut (2.4.2.1), l'accumulation de VP5 dans la membrane plasmique de l'hôte contribue à la libération du virus (Lombardo *et al.*, 2000 ; Méndez *et al.*, 2017).

Enfin, il a été proposé que le cycle de réplication de l'IBDV pouvait être divisé en deux phases majeures : i) une phase précoce, lorsque le taux de transcription et réplication de l'ARN viral, la traduction des protéines et l'assemblage de virus atteignent leur maximum. Pendant cette phase, les particules virales sont libérées en utilisant un mécanisme d'évacuation non lytique (chapitre 2.4.2.1) et ii) une phase tardive, caractérisée par une réduction du métabolisme viral accompagnée de l'apparition d'un effet cytopathogène (ECP) induit par le virus ainsi qu'une augmentation de la mort cellulaire associée à la libération des particules virales intracellulaires restantes (Méndez *et al.*, 2017).

Il a été suggéré que la phase précoce libère surtout des particules virales individuelles, capables de réinfecter de nouvelles cellules et capables d'amplifier rapidement l'infection. Tandis que la phase tardive ou lytique libérerait les amas viraux paracrystallins formés dans le cytoplasme des cellules infectées. Ces amas pouvant contribuer à la survie très importante du virus dans le milieu extérieur.

3. Mécanismes d'évolution des virus IBDV

3.1. Réassortiment

Le réassortiment est, avec les mutations ponctuelles et la recombinaison, l'un des principaux mécanismes d'évolution des virus à ARNdb segmenté ; ces mécanismes façonnent la structure des gènes et du génome et contribuent à la diversité génétique de ces virus. Le génome segmenté de l'IBDV prédispose ce virus au réassortiment qui peut survenir lorsque deux souches virales apparentées co-infectent la même cellule (Kong *et al.*, 2004 ; Le Nouën *et al.*, 2006), ce qui peut conduire à des particules virales filles dont le génome est constitué de deux segments appartenant à deux génogroupes différents. Des études phylogénétiques ont révélé l'existence de plusieurs réassortants naturels pour l'IBDV (tableau 1) : ce phénomène semble jouer un rôle non-négligeable dans l'émergence de nouvelles souches d'IBDV (Le Nouën *et al.*, 2006 ; Wang *et al.*, 2007 ; Wei *et al.*, 2006, 2008). Comme suggéré précédemment pour l'émergence des vvIBDV (Hon *et al.*, 2006), de nombreux facteurs peuvent contribuer au processus de réassortiment tels que la pression vaccinale (utilisation des vaccins vivants atténués), le statut immunitaire des poulets et l'environnement d'élevage (la

Présentation bibliographique

densité de production...) (Wei *et al.*, 2006). Les mécanismes autorisant le réassortiment chez l'IBDV ainsi que les portions génomiques des deux segments A et B jouant un rôle dans ce phénomène restent actuellement méconnus. Chez d'autres virus, d'autres facteurs spécifiques tels que la présence de substitutions spécifiques d'acides aminés dans certaines protéines virales peuvent faciliter le réassortiment comme le cas des rotavirus, virus à ARN double brin, il a été démontré que la protéine non structurale (NSP2) joue un rôle dans la restriction du réassortiment entre les différents groupes de rotavirus (Taraporewala *et al.*, 2006).

Tableau1 : reassortants naturels de l'IBDV selon la bibliographie

Isolat	Sources du segment		Pays	Année	Références
	A	B			
Inconnu	vvIBDV	vvIBDV	Europe	Autour de 1980	Hon <i>et al.</i> , 2006
SH95	vvIBDV	variant	Chine	Inconnue	Sun <i>et al.</i> , 2003
02015.1	vvIBDV	atténué	Vénézuéla	2002	Le Nouen <i>et al.</i> , 2006
ZJ2000	Atténué	vvIBDV	Chine	2000	Wei <i>et al.</i> , 2006
TL2004	Atténué	vvIBDV	Chine	2004	Wei <i>et al.</i> , 2008
7741	vvIBDV	classique	USA	2010	Jackwood <i>et al.</i> , 2016
KZC-104	vvIBDV	classique	Zambie	2004	Kasanga <i>et al.</i> , 2012
HN	Atténué	vvIBDV	Chine	2011	Cui <i>et al.</i> , 2013
D6337	variant	vvIBDV	USA	inconnue	Jackwood <i>et al.</i> , 2016
IBD13HeB01	vvIBDV	classique	Chine	2013	Lu <i>et al.</i> , 2015
CA-K785	vvIBDV	Sérotype 2	USA	2009	Jackwood <i>et al.</i> , 2011
K785	vvIBDV	Sérotype 2	USA	2009	Jackwood <i>et al.</i> , 2016
D495	vvIBDV	Sérotype 2	USA	2009	Jackwood <i>et al.</i> , 2016
100056	vvIBDV	Sérotype 2	France	2010	Soubies <i>et al.</i> , 2016
K669	vvIBDV	Sérotype 2	USA	2011	Jackwood <i>et al.</i> , 2016
D2712	Sérotype2	classique	USA	2012	Jackwood <i>et al.</i> , 2016
JBN2011	vvIBDV	atténué	Corée du Sud	2011	Lee <i>et al.</i> , 2017
100056	vvIBDV	Sérotype 2	France	2009	Soubies <i>et al.</i> , 2016

3.2. Recombinaison génétique

Le phénomène de recombinaison naturelle a été décrit chez de nombreux virus affectant les animaux (Lee *et al.*, 2013). Le risque de recombinaison de vaccins vivants avec des souches sauvages du virus de la laryngotrachéite infectieuse aviaire (ILTV) a bien été décrit dans la littérature (Lee *et al.*, 2012). Ce mécanisme consiste en un échange de matériel génomique viral par « coupure et réassociation » entre deux portions du génome d'un même segment provenant de différentes souches virales. Il est particulièrement fréquent chez les virus chez lesquels la réplication autorise la polymérase à effectuer des sauts de matrice (ex :

Présentation bibliographique

Coronavirus, Rétrovirus). Des études phylogénétiques et des programmes de détection de recombinaisons homologues ont suggéré l'existence de recombinaisons d'origine naturelle dans l'IBDV (Martin *et al.*, 2007 ; Hon *et al.*, 2008 ; He *et al.*, 2009 ; Jackwood *et al.*, 2012 ; Silva *et al.*, 2013). Ce phénomène peut mener à l'apparition et l'émergence de souches d'IBDV antigéniquement et génétiquement diverses et dont le pouvoir pathogène pourrait être modifié (Hon *et al.*, 2008 ; He *et al.*, 2009). La majorité des virus recombinants IBDV rapportés dans la littérature sont des recombinants au niveau de la région hypervariable de la protéine VP2 (tableau 2).

Ainsi, la souche réassortante GX-NN-L dont le segment A est apparenté aux vvIBDV et le segment B apparenté à une souche atténuée, présentait des résidus d'acides aminés putatifs typiques aux souches vvIBDV. Le segment B d'une souche vvIBDV présente 14 résidus d'aa caractéristiques (4V, 13K, 61I, 145T, 146D, 147N, 242E, 287A, 390M, 393D, 508K, 511S, 562P, 687P, et 695R). Or, le segment B de la souche GX-NN-L présente des différences dans 7 positions d'aa (D146E, N147G, E242D, M390L, D393E, P562S, et R695K). Une recombinaison a été donc suggéré pour son segment B entre une souche atténuée et une souche vvIBDV (Chen *et al.*, 2012).

Tableau 2 : recombinants naturels d'IBDV selon la bibliographie

Isolat	VP2 recombinants	Pays	Année	Références
SH-h	Région hypervariable VP2 de vvIBDV (HLJ-5) avec segment A de souche atténuée (D78)	Chine	Inconnue	Hon <i>et al.</i> , 2008 ; He <i>et al.</i> , 2009
KSH/KK1	Région hypervariable VP2 de vvIBDV (SH92) avec segment A de souche atténuée (D78)	Corée	1992 /1997	Hon <i>et al.</i> , 2008 ; He <i>et al.</i> , 2009
849VB	Une partie du segment A de souche atténuée (D78) et une partie de souche vvIBDV (D6948)	Belgique	1987	Hon <i>et al.</i> , 2008
Plusieurs isolats	Séquences d'aa au niveau de la boucle de la région hypervariable P _{BC} et P _{HI} de souche classique d'IBDV et séquences Aa au niveau de la boucle P _{DE} et P _{FG} de souche variante d'IBDV	Venezuela Colombie	2001-2005	Jackwood <i>et al.</i> , 2012
Plusieurs isolats	Séquences d'aa au niveau de la boucle P _{BC} de souche variante d'IBDV avec la boucle P _{DE} et P _{FG} de souche classique d'IBDV	Mexique	2004-2011	Jackwood <i>et al.</i> , 2012
157776	Aa aux positions de 294 à 299 d'une souche vvIBDV avec des résidus d'Aa de la position 222 à 279 d'une souche atténuée	Italie	2003	Martin <i>et al.</i> , 2007
	VP1 recombinants			
OE/G2	Recombinaison entre deux souches vvIBDV (OKYM et OA/G1)	Turquie	Inconnue	Silva <i>et al.</i> , 2012
Harbin-1	Recombinaison entre deux souches vvIBDV, HLJ-7 ou Henan et GZ/96	Chine	Inconnue	Hon <i>et al.</i> , 2008 ; Silva <i>et al.</i> , 2012
GX-NN-L	Recombinaison entre souche vvIBDV et souche atténuée	Chine	2011	Chen <i>et al.</i> , 2012

Présentation bibliographique

3.3. Cas particulier de mutation ponctuelle

Le phénomène de réversion des souches vaccinales et l'un des mécanismes qui pourrait contribuer à la dissémination et à la persistance des souches IBDV sur le terrain.

Les vaccins vivants atténués sont les plus fréquemment utilisés dans la vaccination contre l'IBDV. La réversion de ces souches vaccinales atténuées à des souches plus virulentes a déjà été rapportée dans les conditions de modèles expérimentaux (Yamaguchi et *al.*, 2000 ; Jackwood et *al.*, 2008). Par ailleurs, une souche IBDV adaptée à la culture cellulaire générée par génétique inverse à partir d'une souche vvIBDV a reverté phénotypiquement et génétiquement au pathotype vvIBDV après inoculation à des poulets EOPS (Raue et *al.*, 2004). En pratique, la stabilité des vaccins atténués est vérifiée avant leur autorisation de mise sur le marché (Pharmacopée Européenne) de façon à limiter les risques de réversion.

4. Epidémiologie

4.1. Hôtes naturels et expérimentaux de l'IBDV

Le poulet (espèce *Gallus gallus*) est le seul hôte qui présente des formes cliniques de l'IBD (Helmboldt & Garner, 1964). La dinde (*Meleagris gallopavo*) peut être infectée par les sérotypes 1 et 2 mais ne présente aucun signe clinique de la maladie (McFerran et *al.*, 1980 ; Jackwood & Sommer, 2002). Cependant, un effet immunosuppresseur ainsi que des surinfections ont été suspectés chez des dindes commerciales (Cummings et *al.*, 1986).

Les canards Pékin ou les canards Colvert (*Anas platyrhynchos*) peuvent héberger de façon asymptomatique le virus IBDV de sérotype 1 et des anticorps ont été détectés par séroneutralisation (Yamada et *al.*, 1982), mais aucune lésion macroscopique ou microscopique n'a été observée suite à l'infection (McFerran et *al.*, 1980 ; McNulty et *al.*, 1980). Des anticorps ont été détectés chez des oiseaux sauvages comme les tisserands (*Ploceus cucullatus*), les corbeaux (*Corvus frugilegus*) et les pinsons (*Uraeginthus bengalus*) (Campbell. G., 2001) ainsi que les manchots adélaïdes antarctiques (Gardner et *al.*, 1997 ; Gauthier-Clerc et *al.*, 2002).

La pintade (*Numida meleagris*), le faisan de Colchide (*Phasianus colchicus*), l'autruche (*Struthio camelus*) peuvent également présenter des anticorps anti-IBDV mais ne sont pas décrits comme sensibles à la maladie (Lasher & Shane, 1994 ; Lukert & Saif, 2003).

En Corée, des souches vvIBDV ont été isolées chez différents oiseaux sauvages, dont certaines espèces d'oiseaux aquatiques. La virulence des souches isolées a ensuite été confirmée chez des poulets exempts d'organismes pathogènes spécifiques (EOPS) (Jeon et

Présentation bibliographique

al., 2008). Ces découvertes portent à croire que les oiseaux sauvages peuvent jouer un rôle de réservoirs ou de vecteurs dans l'épidémiologie de l'IBDV (Ogawa *et al.*, 1998 ; Kasanga *et al.*, 2008).

4.2. Distribution géographique

Au début l'IBDV a été identifié dans la plupart des régions des Etats-Unis (Winterfiled & Hitchner, 1964) et en Amérique latine en 1962 (Giron, 1969 ; Banda *et al.*, 2004). Par la suite, l'IBD a été diagnostiqué en Europe, au Royaume Uni en 1962 (MAFF report 1961-1962), en Belgique (Devos *et al.*, 1966), en Allemagne (Landgraf *et al.*, 1967), en Italie (Rinaldi *et al.*, 1965), en Suisse (Riggenbach, 1967), en Espagne (Badiola *et al.*, 1969), en Grèce (Dragonas, 1969), en France (Maire *et al.*, 1969). A partir de 1964, le virus a été isolé en Palestine (Meroz, 1966), en Afrique du Sud (Coetzee, 1970), en Inde (Mohanty *et al.*, 1971), au Japon (Shimizu *et al.*, 1971), en Australie (Firth, 1974) et la Nouvelle-Zélande (Chai *et al.*, 1999). Actuellement, l'IBD est présente dans la plupart des pays pratiquant l'élevage industriel des volailles. Une enquête de l'OIE (Office International des Epizooties) démontre en 1995 une dissémination à l'échelle mondiale du virus (Figure 11) sous différents pathotypes (Etteradossi, 1995). A l'heure actuelle, peu de pays peuvent encore se déclarer indemne de ce virus (Etteradossi & Saif, 2013).

A noter qu'aux USA, la forme hypervirulente de la maladie (forme aiguë) a été isolée en 2009 (Stoute *et al.*, 2009)

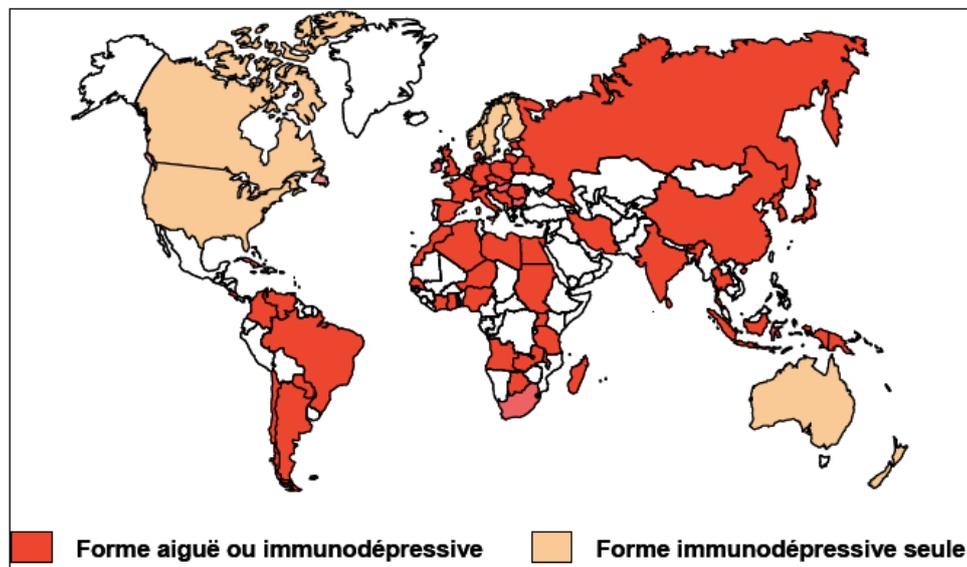


Figure 11 : Répartition géographique mondiale de l'IBD selon sa forme d'expression déterminée à partir d'une enquête de l'OIE (Etteradossi, 1995).

Présentation bibliographique

4.3. Facteurs de sensibilité

C'est à l'âge de 3 à 6 semaines que les poulets sont les plus sensibles aux infections IBDV, lorsque la bourse de Fabricius (organe lymphoïde primaire cible contenant les lymphocytes B) atteint son développement maximale. Les infections durant cette période sont souvent aiguës. Les infections antérieures à l'âge de 3 semaines sont en général sub-cliniques mais néanmoins immunodépressives.

Des études ont montré que les poulets White Leghorn et Brown Leghorn présentaient les réactions les plus sévères et les taux de mortalité les plus élevés suite à une infection par l'IBDV. Cette sensibilité a été attribuée à un panel de gènes, indépendants du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). De plus, les différentes souches de poulet utilisées dans cette étude ont présenté des différences dans leur capacité à transférer les anticorps maternels à leur progéniture (Bumstead *et al.*, 1993). Une étude a démontré aussi que la réponse inflammatoire et l'induction de l'apoptose des lymphocytes B étaient plus rapides chez une lignée résistante à l'infection par rapport à une lignée sensible, ce qui limiterait la réplication virale (Ruby *et al.*, 2006).

D'autres facteurs semblent jouer un rôle favorisant le développement de l'IBD ; les maladies intercurrentes telle que la leucose aviaire (Flensburg *et al.*, 2002) ainsi que la présence de mycotoxines dans l'aliment des oiseaux (Chang & Hamilton, 1982).

4.4. Transmission

L'IBD est une maladie très contagieuse et ubiquitaire. Elle est transmise par voie horizontale (Vindevogel *et al.*, 1976) par contact direct avec des poulets infectés (voie orale ou respiratoire) ou indirect via des vecteurs contaminés comme l'eau de boisson, l'alimentation, la litière, le matériel d'élevage et le personnel. Le virus peut survivre 54 à 122 jours dans un poulailler contaminé, après l'enlèvement des poulets infectés (Benton *et al.*, 1967).

Après infection par l'IBDV, le poulet excrète le virus à partir de 24 heures et ce jusqu'à 16 jours p.i (Winterfiled *et al.*, 1972). Très peu d'études ont été menées sur le rôle que les insectes peuvent jouer en tant que réservoirs d'IBDV. Dans une première étude, une souche d'IBDV prélevée sur un moustique a été incapable de reproduire une forme clinique d'IBD, après avoir été inoculée à des poulets EOPS ((Howie *et al.*, 1981). Selon une autre étude, les formes adultes d' *Alphitobius diaperinus* (ténébrionidés) jouent le rôle de réservoir viral jusqu'à 14 jours après l'exposition (aliments contaminés) ; on notera toutefois que les virus n'ont pas été isolés de manière régulière pendant cette période (McAllister *et al.*, 1995).

Présentation bibliographique

Quant au rôle joué par les rongeurs en tant que porteurs d'IBDV, les seules données disponibles en la matière reposent sur la sérologie positive à l'IBDV de rats provenant de fermes contaminées par l'IBDV (Eterradossi & Saif, 2013).

Enfin, des vvIBDV infectieuses ont été isolés dans des excréments de chiens nourris avec des carcasses de poulets infectés par une souche vvIBDV, jusqu'à 2 jours p.i. (Pages-Mante et *al.*, 2004). Ceci souligne le risque posé par les carnivores domestiques dans la dissémination virale, si les cadavres de volailles infectées ne sont pas enfouis ou détruits.

Présentation bibliographique

5. Aspects cliniques de l'IBD

L'évolution clinique de l'IBD varie considérablement selon le type de souche de poulet, l'âge, la génétique et l'immunité d'origine maternelle des poulets sensibles.

5.1.Symptômes

Les signes cliniques les plus sévères sont observés chez les poulets entre 3 et 6 semaines d'âge (Etteradossi & Saif, 2008). Les infections dues aux souches classiques et vvIBDV sont généralement observées pendant cette période. Chez les jeunes poulets de moins de 2 semaines ou les adultes de plus de 6 semaines, les signes cliniques sont rarement observés (Vervelde & Davison, 1997) mais ces individus peuvent présenter une immunosuppression grave à la suite de la réplication virale.

La période d'incubation de la maladie est très courte. Les signes cliniques apparaissent 2 à 4 jours post-infection (Williams & Davison, 2005) et se manifestent généralement par une prostration sévère des oiseaux, un plumage ébouriffé et souillé, de l'anorexie, des tremblements (Figure 12), une diarrhée blanchâtre très liquide et de la mortalité (Cosgrove, 1962). Les oiseaux atteints présentent un retard de croissance et une déshydratation suite à la baisse de consommation d'aliment et d'eau (Etteradossi & Saif, 2008).



Figure 12 : Symptômes observés à 4 jours post-infection chez un poulet EOPS de 6 semaines infecté par une souche hypervirulente d'IBDV (Photo ANSES-Ploufragan, Cliché : ABED Mouna)

Présentation bibliographique

5.2.Mortalité et morbidité

La morbidité est généralement élevée dans les infections à IBDV classique et vvIBDV et peut affecter jusqu'à 100% du lot. La mortalité est plus variable, elle commence à 3 jours p.i. et dure jusqu'à 5 à 7 jours p.i dans les conditions expérimentales. Sur le terrain, la mortalité peut durer plus longtemps et varie selon plusieurs facteurs (la sensibilité des poulets, la décroissance des anticorps d'origine maternelle) (Chettle *et al.*, 1989). Dans les infections à IBDV classique, la mortalité peut être absente mais peut également atteindre 20 à 30%. Dans les infections à vvIBDV, la mortalité est souvent plus élevée que dans les infections à IBDV classique (Etteradossi & Saif, 2013).

A ce jour, les mécanismes expliquant la différence dans la gravité des signes cliniques ainsi que le taux de mortalité entre souches classiques et souches vvIBDV n'ont pas été élucidés. D'après certains auteurs, le comportement hypervirulent des souches vvIBDV est dû à la plus grande vitesse de réplication de ces virus et aux lésions cellulaires plus importantes induites dans la bourse de Fabricius ainsi que dans d'autres organes lymphoïdes (Tanimura & Sharma, 1998 ; Williams & Davison, 2005). Selon une autre étude, il n'y aurait aucune corrélation entre l'évolution clinicopathologique et la gravité des lésions de la BdF. En effet, cette étude démontre que certains oiseaux qui survivent à l'infection à IBDV présentent de graves lésions dans la BdF, tandis que d'autres qui succombent à cette infection présentent des lésions légères (Ingrao *et al.*, 2013). D'après d'autres auteurs, la réponse immunitaire de l'hôte et plus précisément le niveau de certaines cytokines telles que l'IFN- γ peut jouer un rôle crucial dans le renforcement de la virulence des vvIBDV (Eldaghayes *et al.*, 2006).

Les cas signalés d'infections dues aux souches variantes sur des oiseaux vaccinés avant l'âge de 3 semaines ne présentaient aucun signe clinique (Etteradossi & Saif, 2013). L'inoculation expérimentale du variant américain (VarE) chez des poulets de 1 jours n'a entraîné aucun signe clinique (Elankumaran *et al.*, 2002). Enfin, la mortalité induite par les souches variantes ne dépasse pas le taux de 5% dans les conditions de terrain (Chettle *et al.*, 1989 ; Van den berg *et al.*, 1991 ; 2004). Par ailleurs, la mortalité n'a jamais été observée lors d'inoculation des souches variantes sur des poulets EOPS (Etteradossi & Saif, 2013).

Présentation bibliographique

5.3.Lésions

5.3.1. lésions macroscopiques

Les lésions macroscopiques les plus importantes lors d'infection par l'IBDV se situent dans l'organe cible du virus : la bourse de Fabricius.

L'infection par des souches classiques ou hypervirulentes (2 à 3 jours p.i.) se caractérise par une augmentation significative de la taille de la BdF en raison d'une inflammation aiguë. On remarque parfois un œdème au niveau de la séreuse de la BdF (Flèche, Figure 13) et des pétéchies ou des foyers nécrotiques dans sa surface muqueuse. On peut également observer d'importantes hémorragies dans l'ensemble de l'organe (Figure 14).

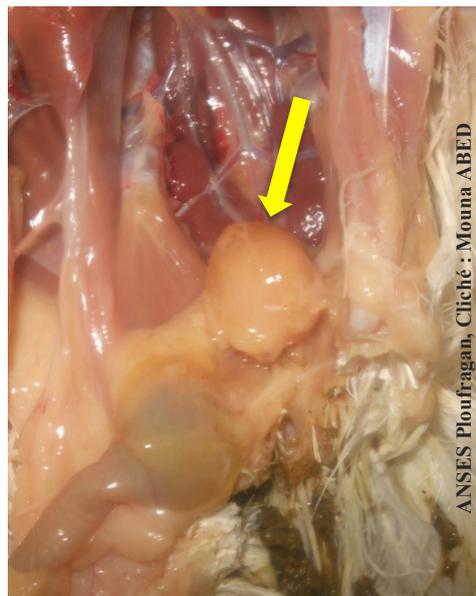


Figure 13 : Hypertrophie et œdème de la séreuse de la bourse de Fabricius (aspect gélatineux)



Figure 14 : Bourse de Fabricius hémorragique

Présentation bibliographique

Les carcasses des oiseaux morts apparaissent déshydratées et d'autres organes peuvent être touchés ; des hémorragies peuvent ainsi être observées au niveau des muscles cruraux, pectoraux (Figure 15) et au niveau de la muqueuse du proventricule (Figure 16). Les reins peuvent être affectés de manière secondaire suite à la déshydratation. Ils sont alors de couleur pâle, hypertrophiés et peuvent contenir des cristaux d'acide urique dans le parenchyme et les uretères.

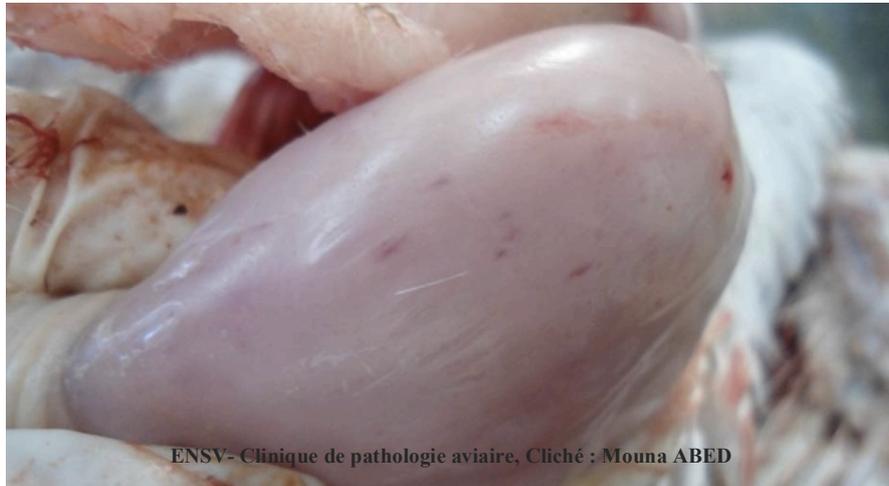


Figure 15 : Hémorragies au niveau des muscles de la cuisse



Figure 16 : Hémorragies du proventricule lors d'infection par l'IBDV

Présentation bibliographique

Les souches variantes ne provoquent aucun signe inflammatoire aigu. L'infection expérimentale par une souche variante VarE a provoqué une atrophie de la BdF observable à 2^{ème} semaine p.i., cette atrophie a persisté jusqu'à 6 semaines p.i. (Elankumaran *et al.*, 2002).

5.3.2. Lésions microscopiques

Les lésions histologiques les plus sévères s'observent au niveau de la BdF, les autres structures lymphoïdes comme la rate, la glande de Harder et les amygdales caecales peuvent aussi présenter des lésions (Cheville, 1967 ; Faragher, 1972).

5.3.2.1. Lésions de la bourse de Fabricius

Lors d'infection aiguë par l'IBDV, la lésion histologique principale observée à un jour p.i. est la lyse lymphocytaire dans la région médullaire des follicules. Les lymphocytes sont remplacés par des hétérophiles, des débris pycnotiques et des cellules réticuloendothéliales hyperplasiques. Au troisième jour p.i., une réponse inflammatoire est observée, caractérisée par un important œdème interstitiel, un afflux d'hétérophiles, un afflux des lymphocytes T (Rautenshlein *et al.*, 2002) et des macrophages (Sharma *et al.*, 2000), une congestion et des hémorragies dans les follicules et dans le stroma intra-folliculaire. A partir du quatrième jour p.i., la réaction inflammatoire diminue, les débris nécrotiques sont éliminés par phagocytose et des cavités kystiques se développent dans la région médullaire des follicules. Ces kystes sont tapissés d'un épithélium colonnaire et souvent remplies d'une matière basophile granuleuse ressemblant à du mucus. Une nécrose et une phagocytose des cellules hétérophiles et des plasmocytes se produisent, l'épithélium superficiel de la BdF devient plié et irrégulier. (Figure 17). Une fibroplasie survient par la suite dans le tissu conjonctif inter-folliculaire (Cheville, 1967 ; Eterradosi & Saif, 2013). Ce type de lésion est irréversible lors d'une atteinte par les virus les plus pathogènes. Dans les cas moins graves, la lésion peut être réversible avec une repopulation lymphocytaire permettant une restauration de la structure initiale de la BdF en environ 15 jours (Henry *et al.*, 1980 ; Kim *et al.*, 1999).

Présentation bibliographique

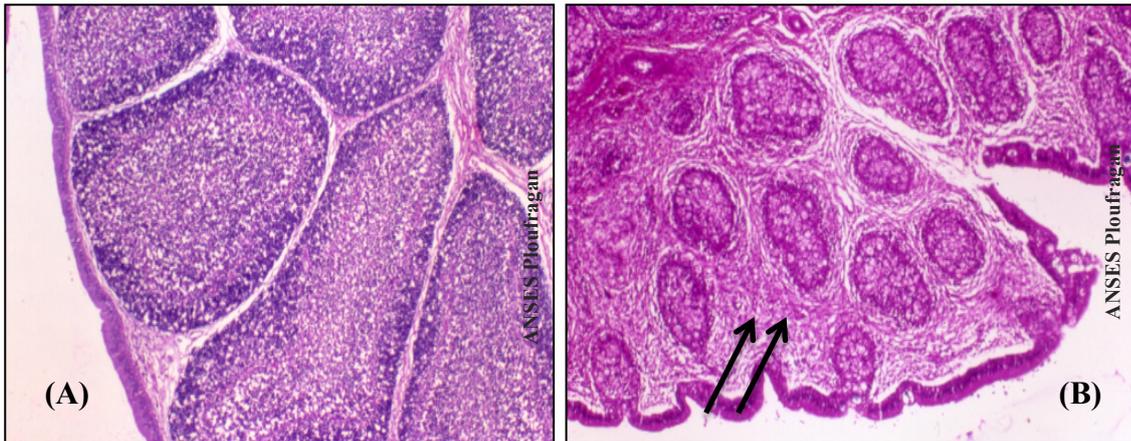


Figure 17 : Analyse de coupes de bourse de Fabricius (BdF) de poulets EOPS âgés de 6 semaines (Grossissement X40).

A) Le sujet témoin (non infecté) présente une BF avec de larges follicules séparés par de fines travées de tissus interstitiel. Ces follicules renferment les cellules lymphocytaires à gros noyaux (coloration bleuâtre) ;

B) Le sujet infecté par un virus IBDV hypervirulent présente (10 jours post-infection) une BF à follicules atrophiés et un tissu inter-folliculaire hyperplasique (flèche). L'atrophie des follicules témoigne d'une déplétion lymphocytaire (Réalisation du Dr Marie Lagadic, ANSES Maisons Alfort).

Lors d'infection expérimentale avec la souche variante (Var A), Sharma *et al.* (1989) ont constaté l'absence de réaction inflammatoire aiguë et la présence de nécrose dans les follicules lymphoïdes était évidente à 3 jours p.i.

Chez les poulets infectés avec le variant américain E/Del, les lésions microscopiques de la BdF apparaissent à 2 semaines p.i. et se caractérisent par une déplétion lymphoïde diffuse, légère à modérée et une nécrose des follicules de la BdF, avec absence totale de réaction inflammatoire. A 4 semaines p.i., on observe une déplétion lymphoïde folliculaire sévère, avec formation de kystes et atrophie de l'épithélium des follicules. A 6 semaines p.i., les kystes folliculaires et l'atrophie de la BdF persistent, mais une fine bande de repeuplement lymphocytaire apparaît à la périphérie de certains follicules (Elankumaran *et al.*, 2002).

Présentation bibliographique

5.3.2.2.Lésions des autres organes

Les lésions histologiques liées à une infection par IBDV dans les autres organes sont non spécifiques et légères. Dans le thymus, une déplétion lymphocytaire corticale peut être observée du fait de l'apoptose des lymphocytes lors d'infection par des souches classiques ou vvIBDV (Inoue *et al.*, 1994 ; Tanimura & Sharma, 1998 ; Williams & Davison, 2005).

Tanimura *et al.*, (1998) ont décrit une légère déplétion lymphocytaire de la gaine périartériolaire de la rate à partir du 3^{ème} jour p.i. ainsi que des hyperplasies des cellules réticuloendothéliales dans cet organe. Ils ont observé aussi une diminution du nombre de cellules lymphoïdes dans les amygdales caecales et de myélocytes dans l'espace extrasinusoïdal de la moelle osseuse.

D'autres auteurs ont observé une diminution de la population de plasmocytes dans la glande de Harder à la suite d'une infection par l'IBDV (Dohms *et al.*, 1988). Les souches variantes (VarE) ne provoquent pas de lésions thymiques ; on observe une déplétion lymphoïde diffuse dans les centres germinatifs et autour des gaines péri-ellipsoïdale et péri-artérielle de la rate à 4 et 6 semaines p.i. (Elankumaran *et al.*, 2002).

6. Pathogénèse et réponse immunitaire de l'hôte

Après avoir pénétré dans l'organisme du poulet par la cavité buccale ou par inhalation, l'IBDV effectue une première réplication dans les macrophages et les lymphocytes de l'intestin. Ce virus a été détecté à 4h p.i. par immunofluorescence dans les macrophages de l'intestin. L'antigène viral a été aussi détecté dans le foie, les reins, la rate et le thymus au cours des premières heures de l'infection. Une première virémie se met en place à 11h p.i. Par la voie hématogène, le virus atteint son principal organe cible, la Bourse de Fabricius (BdF), où il se réplique activement à 13h p.i. (Müller *et al.*, 1979 ; Zhang *et al.*, 2002).

Dans la BdF, le virus se réplique dans les lymphocytes B matures et immatures des follicules lymphoïdes, provoquant l'apoptose et la nécrose de ces populations de cellules (Tanimura *et al.*, 1995 ; Tanimura & Sharma, 1998 ; Williams *et al.*, 2005). Des études expérimentales menées sur des souches vvIBDV ont démontré que les premiers lymphocytes B infectés et détruits sont les lymphocytes B Bu-1⁺ médullaires (précurseurs des lymphocytes B), suivis des lymphocytes B IgM⁺ et IgG⁺ médullaires et de leurs homologues corticaux (Williams *et al.*, 2005). La population de lymphocytes B IgM⁺ et IgG⁺ de la BdF est totalement détruite et il faut attendre 14 jours pour qu'elle commence à se renouveler.

Les lymphocytes T jouent également un rôle-clé dans la pathogénèse de l'IBDV et dans la lutte contre les infections à IBDV. Après la réplication de l'IBDV dans les lymphocytes B, les

Présentation bibliographique

lymphocytes T activées affluent dans la BdF (Sharma *et al.*, 2000 ; Williams *et al.*, 2005). A 7 jours p.i., le nombre de lymphocytes T CD4⁺ a augmenté et leur localisation se limite à la jonction corticomédullaire des follicules lymphoïdes, tandis que les lymphocytes T CD8⁺ sont présents dans l'ensemble des follicules de la BdF (Williams *et al.*, 2005). Ces lymphocytes T ne constituent pas des cibles de l'infection et de la réplication de l'IBDV ; ils interviennent dans la clairance virale et le repeuplement lymphocytaire de la BdF, après l'infection (Kim et Sharma, 2000 ; Kim *et al.*, 2000 ; Williams *et al.*, 2005). Des études ont mis en évidence une augmentation de l'expression des gènes de cytokines des lymphocytes Th1 (IFN- γ , IL-2 et IL-12) et Th2 (IL-4, IL-5, IL-13 et IL-10) dans la BdF après l'inoculation d'une souche vvIBDV (Rautenschlein *et al.*, 2003 ; Liu *et al.*, 2010), renforçant l'hypothèse que les lymphocytes T contribuent à la pathogénèse des infections IBDV. Par ailleurs, des études comparatives de la réponse immunitaire développée contre une souche classique et une souche de vvIBDV ont démontré que toutes deux induisent une réponse pro-inflammatoire qui se traduit par une augmentation de la transcription d'ARNm d'IL-1 β , d'IL-6 et de CXCLi2, ainsi que par une diminution de la production de TGF- β 4, d'ampleur et de durée similaires. Il convient de souligner que la transcription de l'ARNm IFN- γ est induite par les deux souches, quoique dans une plus grande mesure par la souche vvIBDV, ce qui laisse penser que l'expression de cette cytokine peut être affectée par la plus forte virulence de la souche vvIBDV (Eldaghayes *et al.*, 2006). D'après les conclusions d'une autre étude, les lymphocytes T peuvent également jouer un rôle-clé dans la stimulation des macrophages de la BdF, par la production d'IFN- γ (Ingrao *et al.*, 2013). Les macrophages de la BdF sont le siège de la réplication virale (Tanimura *et al.*, 1995). Ils sont activés pendant la phase aiguë de l'infection à IBDV et cette activation s'accompagne d'une augmentation de l'expression des cytokines IL-6, IL-1 β et IL-8 et de l'ARNm d'iNOS, ce qui peut expliquer la forte réponse inflammatoire observée dans les infections à IBDV aiguës (Kim & Sharma, 2000 ; Khatri *et al.*, 2005).

On dénombre peu d'études détaillées décrivant les altérations des autres organes autres que la BdF (Rautenschlein *et al.*, 2003 ; Ingrao *et al.*, 2013). La réplication de l'IBDV dans les lymphocytes et les macrophages du thymus, de la rate, des tonsilles cecales et de la moelle osseuse, ainsi que la déplétion cellulaire associée dans tous ces organes, surviennent entre 12 heures et 7 jours p.i. (Tanimura *et al.*, 1995). Williams et Davidson, 2005 ont décrit la réplication d'une souche vvIBDV dans le thymus, entre 4 et 7 jours p.i. associée à une déplétion lymphoïde du thymus. Or, selon ces auteurs, les lymphocytes B thymiques sont le siège de la réplication virale et il semble peu probable que l'IBDV infecte directement et se

Présentation bibliographique

réplique dans les lymphocytes T du thymus.

Plusieurs auteurs se sont intéressés à la pathogénèse des hémorragies observées chez les animaux infectés par certaines souches IBDV, mais l'origine de ces lésions n'a pas été entièrement établie. Certains auteurs émettent l'hypothèse d'une réaction d'hypersensibilité de type III avec formation et dépôt de complexes immuns, sans pour autant la démontrer (Skeeles *et al.*, 1979 ; Skeeles *et al.*, 1980).

Un allongement du temps de coagulation a par ailleurs été détecté chez des poulets infectés par l'IBDV et selon certains auteurs, l'un des facteurs déterminants de la pathogénèse des hémorragies serait une coagulopathie acquise induite par l'infection virale (Kosters *et al.*, 1972 ; Skeeles *et al.*, 1980). Les mécanismes par lesquels l'IBDV provoquerait cette coagulopathie acquise demeurent cependant inconnus.

Concernant l'immunopathogénèse comparative des infections provoquées par les souches classiques ou les variants de l'IBDV, Sharma *et al.* (1989) ont démontré que les virus classiques et variants provoquent tous deux d'importantes lésions macroscopiques et histologiques dans la BdF. Toutefois, la nécrose de la BdF induite par la souche classique s'accompagne d'une réponse inflammatoire, alors que cette composante inflammatoire est absente dans les lésions induites par le variant.

- Réponse immunitaire cellulaire

Selon une étude plus récente, il existe des différences significatives entre les souches classiques et les variants de l'IBDV, non seulement quant à l'atteinte de la BdF, mais aussi en termes d'infiltration des lymphocytes T et d'expression des cytokines, des chimiokines et des récepteurs de type Toll (TLR, de l'anglais Toll-Like Receptor) dans la BdF. Une infection induite par une souche d'IBDV classique entraîne une plus forte expression des cytokines naturelles (IFN- γ , IFN- β), des cytokines et des médiateurs pro-inflammatoires (IL-6 et iNCOS) et des chimiokines (IL-8 et MIP- α), qu'une infection induite par un variant de l'IBDV (Rauf *et al.*, 2011). Il a été proposé que les lymphocytes T pouvaient moduler le pouvoir pathogène d'une souche en limitant le niveau de réplication virale dans la BdF par libération de cytokines inflammatoires, qui favoriseraient les dommages tissulaires et retarderaient la cicatrisation des tissus (Rautenschlein *et al.*, 2002).

L'effet du facteur génétique des poulets sur l'immunopathogénèse des infections à IBDV a également été évalué. Un renforcement de la stimulation des réactions immunitaires innées, notamment après une infection à vvIBDV en phase précoce, peut entraîner une

Présentation bibliographique

accélération et une aggravation de l'évolution clinique, des lésions et du taux de mortalité chez les poules reproductrices, comparées aux poulets de chair (Aricibasi *et al.*, 2010).

- Réponse immunitaire humorale

Des titres d'anticorps spécifiques anti-IBDV ont été détectés dans les sérums de poulets naturellement ou expérimentalement infectés par l'IBDV (Eterradossi & Saif, 2013).

Les anticorps neutralisants sont dirigés contre les épitopes conformationnels localisés dans les boucles du domaine projeté de la protéine VP2 (Fahey *et al.*, 1991, Snyder *et al.*, 1992). La réponse humorale peut ne pas protéger contre des souches IBDV antigéniquement différentes. Les anticorps dirigés contre la protéine VP3 ne sont pas neutralisants (Azad *et al.*, 1987 ; Fahey *et al.*, 1991 ; Becht *et al.*, 1988).

Cependant, des variations ont été observées en fonction de la pathogénicité des souches en ce qui concerne le temps d'apparition et le titre des anticorps neutralisants. En effet, quelle que soit la lignée de poulet, les souches classiques et les souches vvIBDV semblent induire une réponse en anticorps plus rapide en comparaison d'une souche vaccinale et la réponse en anticorps liée à une infection par un vvIBDV semble être la plus importante à 7 jours p.i. (Aricibasi *et al.*, 2010).

Les anticorps d'origine maternelle (AcM) assurent une protection passive dans les premières semaines après l'éclosion. Les poulets porteurs d'AcM ont développé significativement moins de lésions au niveau de la BdF que les poulets ne possédant pas d'AcM après une infection expérimentale par l'IBDV (Van den Berg *et al.*, 1992 ; Hassan *et al.*, 2002 ; Aricibasi *et al.*, 2010).

- Destruction de l'immunité

L'IBDV interagit avec plusieurs cellules immunitaires (lymphocytes B, lymphocytes T, macrophages), entraînant une désorganisation complexe du système immunitaire du poulet et une immunosuppression chez le poulet. De nombreuses études ont démontré chez les poulets infectés par l'IBDV, une augmentation de la sensibilité à d'autres maladies telles que l'hépatite à corps d'inclusion, la colibacillose, les coccidioses ou la bronchite infectieuse (Eterradossi & Saif, 2013).

La réplication de l'IBDV dans les lymphocytes B matures et immatures de la BdF entraîne une réduction des lymphocytes B IgM⁺ circulants et un affaiblissement de la réponse immunitaire humorale (Sivanandan & Maheswaran, 1980 ; Eterradossi & Saif, 2013 ; Ingrao *et al.*, 2013). Les premières études sur le sujet ont considéré que : l'inhibition de la réponse immunitaire humorale est plus importante lorsque l'infection à IBDV survient chez les jeunes

Présentation bibliographique

oiseaux (jusqu'à l'âge de 7 jours) et inversement, ses effets sont plus limités lorsque les oiseaux sont infectés plus tardivement (Faragher *et al.*, 1974).

Plusieurs études décrivent l'effet de l'IBDV dans l'immunité cellulaire. L'IBDV agit sur les lymphocytes T ayant infiltrés la BdF durant l'infection pour qu'ils inhibent la réponse mitogénique normale des lymphocytes T de la rate (Kim *et al.*, 2000 ; Rautenschlein *et al.*, 2003). Selon une autre étude, la réponse immunitaire des lymphocytes T est affaiblie pendant la phase de guérison d'une infection à IBDV, cet affaiblissement étant lié à une diminution de l'expression de l'IFN- γ (Ingrao *et al.*, 2013). Les macrophages de la BdF sont le siège de la réplication virale et leur activité phagocytaire ainsi que leur expression des gènes des cytokines sont altérées après une infection à IBDV, influençant certainement la réactivité normale des oiseaux infectés (Khatri *et al.*, 2005).

Présentation bibliographique

7. Diagnostic

Le diagnostic clinique de l'IBD lors d'infections aiguës est généralement basé sur les signes cliniques, la mortalité et les lésions macroscopiques observées dans la BdF. Néanmoins, notamment lorsqu'il y a suspicion d'infection subclinique, il est vivement recommandé de confirmer, en laboratoire, la présence de l'IBDV dans les tissus. Il convient par ailleurs de souligner que plusieurs des lésions macroscopiques décrites pour l'IBDV peuvent également être liées à d'autres pathologies (tableau 3).

Tableau 3 : Diagnostic différentiel de l'IBD avec les autres maladies chez la volaille

Maladie	Lésion			
	BdF hypertrophiée, œdémateuse, et/ou hémorragique	BdF atrophique	Hémorragies musculaires et proventriculaires	Néphropathie
Bursite infectieuse aviaire	X	X	X	X
Mycotoxicose		X	X	X
Marek		X		
Anémie infectieuse		X		
Bronchite infectieuse				X
Influenza aviaire			X	
Newcastle			X	

Il existe actuellement un certain nombre de techniques de diagnostic qui permettent de détecter et caractériser les souches IBDV :

7.1. Diagnostic virologique

Pour permettre le diagnostic virologique, il est important que le virus soit détecté pendant la phase aiguë de la maladie. Il peut se faire par isolement viral, par détection des antigènes viraux ou par des méthodes de biologie moléculaire.

Présentation bibliographique

7.1.1. Isolement viral

L'isolement viral est possible sur plusieurs supports (cultures cellulaires, œufs embryonnés EOPS ou poulets EOPS) (Etteradossi & Saif, 2013). C'est une méthode extrêmement sensible mais longue, coûteuse à réaliser et rarement utilisée pour le diagnostic de l'IBDV sur des cas terrains.

7.1.1.1. Isolement viral sur cultures cellulaires

L'isolement et la réplication du virus prélevé sur le terrain dans des primo-cultures (des cellules fibroblastes ou cellules rénales d'embryon de poulet) ou dans les lignées cellulaires (DF1, BGM, Véro), sont des opérations relativement complexes qui requièrent l'adaptation des virus par des passages en série sur ces cultures cellulaires dans le but d'induire des modifications au niveau du génome viral (Yamaguchi *et al.*, 1996). Il semble que l'isolement viral de l'IBDV peut se faire sans adaptation à la culture cellulaire sur des lymphocytes B issues de BdF de poulets (Soubies *et al.*, 2017). Les premières cultures cellulaires utilisées pour l'IBDV étaient les cultures primaires ou les lignées cellulaires de lymphocytes B et cela en raison de la nature de l'organe cible. Les cultures primaires de fibroblastes de poulet (CEF, de l'anglais Chick Embryo Fibroblasts) sont les plus utilisées et sont préparées à partir d'embryons de poulets exempts d'organismes pathogènes spécifiés (EOPS) âgés de 9 à 10 jours. La multiplication du virus sur ces cultures entraîne l'apparition dans les 24 à 48 heures d'un effet cytopathogène (ECP) caractérisé par l'apparition d'amas de cellules rondes réfringentes observables au microscope optique (Etteradossi & Saif, 2013).

7.1.1.2. Isolement viral sur œufs embryonnés

Les souches d'IBDV peuvent être isolées dans des œufs EOPS de poulet non immunisés contre l'IBDV de 9 à 11 jours, infectés au niveau de la membrane chorioallantoïdienne ou par voie intravitelline. La mort des embryons infectés survient généralement entre 3 et 7 jours p.i. Les embryons présentent des lésions de congestion ou d'œdème cutanés, des hémorragies, parfois accompagnés d'hémorragies cérébrales et aux articulations des pattes lors d'infection par une souche classique, atténuée ou vvIBDV (Figure 18). Les souches variantes induisent une augmentation du volume de la rate ainsi qu'une nécrose du foie. Les souches du sérotype 2 se multiplient difficilement sur ce support et n'induisent pas de lésions même si les embryons semblent plus petits. Une suspension virale d'IBDV peut être préparée à partir du corps des embryons broyés dans une solution saline. (Etteradossi & Saif, 2013).

Présentation bibliographique

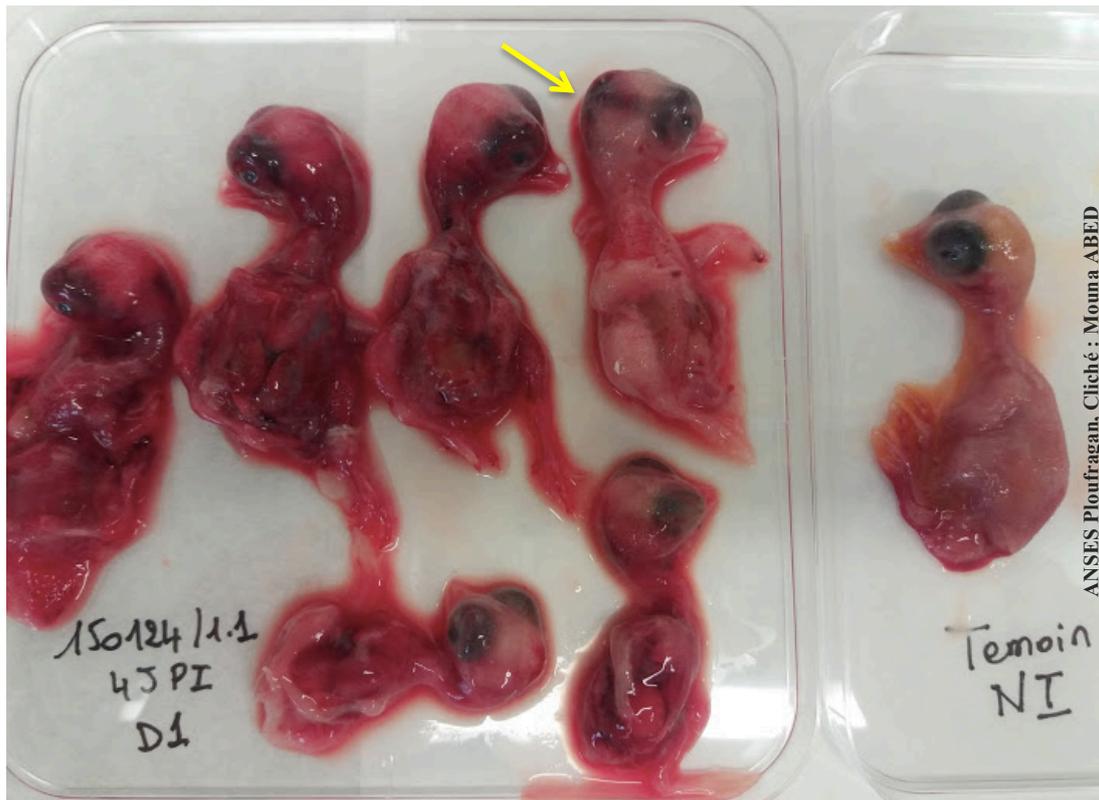


Figure 18: Embryons de poulet EOPS âgés de 10 jours ; à droite, embryon sain non inoculé, à gauche, des embryons lésés par une souche Algérienne réassortante d'IBDV. Les embryons infectés présentent un état oedémateux au niveau de la tête avec un aspect général congestionné, des hémorragies généralisées sur le corps ou sur la partie postérieure du crâne (flèche). (Photo ANSES Ploufragan, cliché : ABED Mouna)

7.1.1.3. Isolement viral sur poulets

Des poulets âgés de 3 à 7 semaines sont également utilisés pour l'isolement viral. La voie d'inoculation utilisée est la voie intranasale ou la voie occulo-nasale. Les premiers signes cliniques peuvent apparaître dans les 2 jours p.i. La BdF est récupérée 3 à 4 jours p.i et une suspension virale est donc préparée à partir d'un homogénat de celle-ci afin de confirmer la présence de l'IBDV par des techniques moléculaires (voir 6.1.3) (Eterradossi & Saif, 2013).

7.1.2. Détection des antigènes viraux

L'IDG ou test d'immunodiffusion double en gélose peut être utilisé pour une suspension virale, il consiste en l'interaction de l'antigène à tester avec un antisérum spécifique ou avec un AcMo. L'apparition de lignes de précipitation visible à l'œil nu sur l'épaisseur du gel signifie la présence d'antigènes viraux (Eterradossi & Saif, 2013).

Présentation bibliographique

Des tests ELISA de capture antigénique (AC-ELISA) sont utilisés pour capturer les antigènes viraux à l'aide d'anticorps anti-IBDV monoclonaux ou polyclonaux couplé à un support polystyrène. Un anticorps secondaire, capable de se lier à l'antigène capturé est alors ajouté dans les puits. Cet anticorps secondaire est couplé à une peroxydase et peut donc être quantifié par colorimétrie. L'utilisation d'une batterie d'AcMo va permettre une caractérisation de la réactivité antigénique du virus capturé (Snyder *et al.*, 1994).

Enfin, les lésions microscopiques liées à une infection par une souche classique ou vvIBDV, observées dans la BdF d'animaux atteints de la phase aiguë de la maladie, sont spécifiques et caractéristiques de ce processus viral. Dans ce cas il est conseillé de confirmer la présence de l'IBDV dans les tissus au moyen d'une immunofluorescence ou d'une coloration à l'immunoperoxydase, avec des anticorps monoclonaux ou polyclonaux. Ces techniques de détection sont très spécifiques, mais elles sont moins sensibles que les analyses moléculaires.

7.1.3. Détection du génome au moyen de techniques moléculaires

Le diagnostic moléculaire de infections à IBDV constitue la méthode de prédilection pour la détection et la classification des souches IBDV en circulation dans un élevage. Différentes techniques de PCR après transcription inverse (RT-PCR, de l'anglais Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction) ont été mises au point pour cibler la région hypervariable de la VP2 de toute les souches d'IBDV (Wu *et al.*, 1992 ; Jackwood & Nielson, 1997).

Cette méthode à la fois rapide et très sensible peut être mise en œuvre sur des échantillons de BdF ou des tissus recueillis sur des cartes FTA® qui peuvent être conservées à température ambiante. Des techniques de RT-PCR multiplex (Kusk *et al.*, 2005) ou de RT-PCR en temps réel (Jackwood *et al.*, 2003) destinées à détecter et à différencier les souches d'IBDV ont également été mises au point.

7.1.4. Caractérisation des souches d'IBDV

Après la détection de l'IBDV par RT-PCR, les échantillons prélevés sur le terrain sont généralement soumis à des analyses moléculaires destinées à mieux identifier le virus détecté, par exemple pour différencier les souches naturelles des souches vaccinales. Les deux méthodes principalement utilisées sont les suivantes : - le polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP, de l'anglais Restriction Fragment Length Polymorphism), - le séquençage du fragment amplifié par RT-PCR.

Présentation bibliographique

Dans la technique RFLP, le produit RT-PCR amplifié est coupé par différentes enzymes de restriction et les fragments obtenus sont visualisés par électrophorèse (Jackwood *et al.*, 1997). Le profil RFLP (longueur et nombre de fragments) de la souche recueillie sur le terrain est ensuite comparé à celui des souches de référence, puis affecté à un groupe moléculaire donné. Le principal inconvénient de cette technique est que les informations qu'elle fournit concernent un nombre très limité de nucléotides du gène VP2 et qu'elle aboutit souvent à la description de nouveaux profils sur la base d'un petit nombre de modifications nucléotidiques.

A l'heure actuelle, la technique la plus utilisée pour le génotypage des souches IBDV est donc le séquençage du fragment amplifié par RT-PCR (Brown *et al.*, 1992 ; Le Nouën *et al.*, 2005). Le séquençage de ce fragment permet d'obtenir des informations détaillées sur les modifications nucléotidiques survenues dans une région partielle des gènes VP2 et VP1, voire même dans les deux segments complets.

Une comparaison phylogénétique du fragment de gène amplifié à des souches de référence trouvées sur GenBank permet d'affecter la souche recueillie sur le terrain à un génotype donné. Dans l'analyse des parentés génétiques détectées par phylogénie, il faut garder à l'esprit que les mutations nucléotidiques n'entraînent pas toujours des modifications antigéniques dans la protéine virale. Par ailleurs, des mutations ponctuelles peuvent modifier le phénotype de souches virales génétiquement apparentées à des génotypes connus. Ainsi ponctuellement, certaines souches IBDV apparentées aux souches vvIBDV par leur gène VP2 seraient moins virulentes du fait de mutations ponctuelles survenant dans les gènes codant les protéines VP2 ou VP1 (Le Nouën *et al.*, 2006 ; Escaffre *et al.*, 2013). Il est donc recommandé d'effectuer des études de pathogénèse lorsque les résultats des analyses moléculaires ne concordent pas avec les observations du terrain.

Enfin la caractérisation complète d'une souche d'IBDV nécessite l'emploi de multiples techniques : i) étude du pouvoir pathogène par des essais expérimentaux *in vivo* sur poulets EOPS, ii) génotypage par séquençage partiel des deux segments, iii) sérotypage et typage antigénique en utilisant les AcMo (Eterradossi, 1995).

7.2. Diagnostic sérologique

Compte tenu du caractère très largement répandu des IBDV pathogènes ou non, la plupart des oiseaux sensibles s'infectent et présentent des anticorps, lesquels ne permettent pas de différencier les souches virales en cause. Le développement de tests pour quantifier les anticorps induits par l'IBDV n'est donc pas essentiel pour diagnostiquer la maladie.

Présentation bibliographique

La détection et la quantification des anticorps dirigés contre l'IBDV sont principalement utilisées dans les buts suivants : i) mesure du taux d'anticorps maternels chez les poussins de 1 jour afin de déterminer le jour de vaccination, ii) détection des infections subcliniques, iii) évaluation de la réponse à la vaccination contre l'IBDV à l'entrée en ponte chez les reproducteurs. Il existe plusieurs commerciaux pour l'ELISA quantitative, certains ont la capacité de détecter les anticorps neutralisants (dirigés contre VP2) seulement. D'autres détectent les anticorps neutralisants et non neutralisants (dirigés contre VP2 et VP3).

Les résultats de l'ELISA peuvent différer d'un laboratoire à un autre mais aussi d'un kit à un autre. C'est pour cela, il est recommandé d'utiliser des sérums internes comme témoin de validation de la manipulation.

La détection des anticorps anti-IBDV peut être faite par séroneutralisation virale (SN) révélée sur culture cellulaire. Cette technique de réalisation lourde est assez sensible mais ne produit pas de résultat qu'après 5 jours d'incubation (Eterradossi & Saif, 2013).

8. Traitement

A l'heure actuelle, aucun traitement spécifique contre l'IBDV n'est utilisé sur le terrain. Cependant, les animaux atteints peuvent être aidés avec des molécules pour traiter les symptômes afin de contrôler les surinfections et les effets secondaires de l'immunosuppression.

9. Prophylaxie

L'IBDV est un virus très résistant aux conditions physiques et aux produits chimiques. Cette résistance lui permet une grande persistance dans l'environnement. Donc, il est primordial de combiner des mesures de prophylaxie sanitaire et médicale pour lutter contre la maladie.

9.1. Prophylaxie sanitaire

Aucun vaccin ne peut être efficace contre la maladie si les mesures de biosécurité dans les élevages ne sont pas respectées. L'objectif par ces mesures est de limiter les risques d'introduction du virus dans un environnement sain, d'éviter sa persistance ou limiter la charge de virus persistant dans les bâtiments qui ont été contaminés. Ces mesures reposent sur la restriction d'accès aux bâtiments pour les différents vecteurs du virus et sur les bonnes pratiques de nettoyage et désinfection des bâtiments d'élevages en prenant compte le choix des produits ainsi que leur mode d'utilisation, le bon nettoyage et désinfection du matériel

Présentation bibliographique

d'élevage, l'élimination des insectes et des rongeurs, la gestion et l'élimination de la litière, le respect de la durée du vide sanitaire ainsi que le bon nettoyage et désinfection des silos d'aliment.

9.2. Prophylaxie médicale

La prophylaxie médicale est basée sur l'immunisation des poulets par la vaccination. La réussite de la vaccination dépend de différents facteurs, essentiellement : i) le statut immunitaire des poulets, ii) le profil des virus sauvages circulants, iii) la souche vaccinale, iv) l'âge de vaccination et v) le protocole vaccinal.

Le protocole de vaccination va dépendre essentiellement de la souche sauvage présente sur le terrain et de la pression virale. Il est indispensable de connaître le profil des souches naturelles en circulation ou impliquées dans les épizooties de l'IBD car des modifications antigéniques et pathogéniques de ces souches peuvent réduire l'efficacité des vaccins ou rendre nécessaire le recours à des programmes de vaccination renforcés.

Plusieurs types de vaccins sont disponibles actuellement, vaccins vivants atténués, vaccins à virus inactivé et vaccins de nouvelles générations (immuns-complexes, recombinants et sous-unitaires).

9.2.1. Vaccins vivants atténués

Ce sont des vaccins développés à partir de souches de sérotype 1 dont le pouvoir pathogène est absent ou a été réduit après plusieurs passages successifs sur des œufs embryonnés EOPS ou sur des cultures cellulaires. Les vaccins vivants imitent l'infection des virus sauvages chez l'hôte, ils se répliquent dans la BdF. Ce faisant, ils peuvent induire une réponse immunitaire très complète, mais sont aussi susceptibles d'être neutralisés par les anticorps d'origine maternelle. Ils ne nécessitent pas d'adjuvants pour être efficaces et ils sont adaptés à la vaccination en masse puisqu'ils peuvent être administrés par les voies naturelles (eau de boisson, nébulisation). Ces vaccins peuvent avoir des inconvénients comme le retour à la virulence (la réversion à l'état sauvage) (Yamaguchi *et al.*, 2000 ; Raue *et al.*, 2004 ; Jackwood *et al.*, 2008) et la virulence résiduelle de certaines souches (Prandini *et al.*, 2016).

La plupart des vaccins vivants commercialisés contre l'IBDV ont été obtenus à partir de souches virulentes classiques. Ils diffèrent les uns des autres par leur pouvoir pathogène résiduel, leur capacité à induire des lésions de la BdF et leur diversité antigénique. Les souches vaccinales sont ainsi dénommées douces, intermédiaires ou invasives (ces dernières appelées aussi « intermédiaires plus », « chaudes » ou « hot ») en fonction de niveau

Présentation bibliographique

d'atténuation décroissant.

Les souches dites « douces » présentent une efficacité médiocre en présence de certains niveaux d'anticorps d'origine maternelle. Les souches dites « intermédiaires » et « intermédiaires plus » ont une meilleure efficacité en présence de niveaux même modestes d'anticorps d'origine maternelle mais elles peuvent induire des lésions modérées à sévères au niveau de la BdF et par conséquent provoquer de l'immunodépression (Mazariegos *et al.*, 1990 ; Kumar *et al.*, 2000 ; Rautenschlein *et al.*, 2005). Ils peuvent aussi ne pas conférer une protection complète contre les souches vvIBDV (Rautenschlein *et al.*, 2005) ou les souches variantes antigéniques (Müller *et al.*, 2012).

Par conséquent, l'une des décisions déterminantes à prendre dans le cadre de l'élaboration des programmes de vaccination est l'âge auquel les oiseaux doivent être vaccinés : d'une part, le vaccin ne peut pas être administré lorsque les oiseaux présentent un taux d'anticorps maternels encore susceptible de neutraliser le virus vaccinal et d'autre part, le vaccin doit être administré suffisamment tôt pour protéger les oiseaux des infections contractées sur le terrain.

Différentes formules mathématiques ont été proposées pour calculer l'âge de vaccination idéal en fonction du taux d'anticorps maternels à l'âge de 1 jour et du niveau d'atténuation du virus vaccinal. Cependant, ces formules sont souvent inapplicables lorsque les souches circulantes sur le terrain sont des vvIBDV. Ces souches persistent souvent dans l'élevage et comme elles sont très virulentes, elles peuvent infecter des poussins encore porteurs d'un niveau d'AcMat élevé. De ce fait, l'âge de vaccination calculé se révèle souvent trop tardif en milieu déjà contaminé par les vvIBDV aboutissant à l'échec de vaccination (Wit and De Wit, 1999).

9.2.2. Vaccins inactivés

Ces vaccins inactivés anti-IBDV disponibles dans le commerce comportent des antigènes constitués de virus entiers inactivés au formol ou à la bêta-propiolactone additionnés d'adjuvant. Ils sont incapables de se répliquer dans la BdF.

Bien qu'ils soient plus sûrs puisqu'ils ne contiennent aucun virus vivant, les antigènes qu'ils contiennent sont moins immunogènes que les vaccins vivants. Pour renforcer leur pouvoir immunogène, il faut donc les mélanger avec des adjuvants, principalement des émulsions de type eau dans l'huile (Müller *et al.*, 2012). Ils doivent être administrés par injection individuelle, ce qui est coûteux. Par conséquent, ces types de vaccins sont essentiellement réservés aux reproducteurs afin d'induire des taux d'anticorps anti-IBDV élevés et

Présentation bibliographique

homogènes qui créent une immunité passive chez les descendants au moyen d'anticorps d'origine maternelle (Etteradossi & Saïf, 2013).

9.2.3. Vaccins recombinants ou vectorisés

Les vaccins recombinants ou vectorisés contre l'IBDV reposent sur l'insertion du gène codant la protéine VP2 d'IBDV (le donneur, le seul antigène induisant une réponse protectrice contre l'IBDV) dans le génome d'un autre organisme, généralement un autre virus (le vecteur) pour déclencher une immunité protectrice contre les deux organismes (Müller *et al.*, 2012). La littérature décrit plusieurs virus utilisés comme vecteur pour le gène VP2, nous citons : le Fowlpoxvirus, le virus de la maladie de Newcastle, l'herpes virus de la dinde, le virus de maladie de Marek, l'adénovirus aviaire et la bactériophage T4 (Heine *et al.*, 1993 ; Huang *et al.*, 2004 ; Perozo *et al.*, 2008 ; Shaw & Davison, 2000 ; Tsukamoto *et al.*, 2002 ; Xu *et al.*, 2011 ; Darteil *et al.*, 1995 ; Cao *et al.*, 2005 ; Francois *et al.*, 2004). A notre connaissance, les seuls vaccins vectorisés commercialisés sont des vaccins contenant la VP2 de l'IBDV et utilisant l'herpèsvirus de la dinde (HVT) comme vecteur. Plusieurs études ont été publiées à propos de l'efficacité de ces vaccins contre les souches vvIBDV et les souches variantes de l'IBDV (Bublôt *et al.*, 2007 ; Le Gros *et al.*, 2009 ; Perozo *et al.*, 2009).

9.2.4. Vaccins immuns complexes

Les vaccins de immuns complexes consistent en un mélange préformé entre une souche vaccinale atténuée d'IBDV et des anticorps anti-IBDV produits par hyperimmunisation de poulets EOPS. Cette technologie permet d'utiliser des IBDV vivants atténués en présence de forts taux d'anticorps maternels, car ce virus vaccinal serait recouvert et protégé par des anticorps spécifiques favorisant la prise en charge rapide du complexe antigène-anticorps par le système immunitaire de l'animal vacciné. Ces vaccins immuns complexes peuvent ainsi être administrés *in ovo* ou par voie sous-cutanée à l'âge de 1 jour chez des sujets porteurs d'AcM. Le mode de fonctionnement de ce type de vaccin reste peu élucidé. Certaines études sur leur mode de fonctionnement sur des poulets EOPS ont permis de démontrer que l'association du virus vaccinal avec des anticorps spécifiques (immuns complexes) retarde la réplication du virus environ 5 jours par rapport à l'inoculation du virus vaccinal seul (Jeurissen *et al.*, 1998). Cependant, le virus vaccinal de l'immun-complexe n'a pas pu être détecté avant sa réplication, si bien que l'endroit où il se localise après l'injection n'a pas pu être mis en évidence. D'autres études ont été réalisées sur des poulets possédant des anticorps maternels : après vaccination *in ovo* avec des vaccins immuns complexes, le

Présentation bibliographique

virus vaccinal a uniquement pu être détecté par PCR en temps réel dans la BdF, à partir de l'âge de 21 jours (Ivan *et al.*, 2005).

9.2.5. Vaccins sous-unitaires

Ce sont des vaccins obtenus après production de molécules antigéniques, essentiellement la protéine VP2, par génie génétique dans un système d'expression. Différents systèmes d'expression ont été utilisés, tels que *E.coli* (Rong *et al.*, 2007), levure *Pichia pastoris* (Fayeh *et al.*, 1991), Fowlpoxvirus (Bayliss *et al.*, 1991), Baculovirus (Vakharia *et al.*, 1993) et des systèmes d'expression végétale (Wu *et al.*, 2004). Ces vaccins comme les vaccins inactivés sont soumis à des exigences comme l'administration parentérale, l'immunisation de rappel et l'association à des adjuvants. Leur capacité à induire une réponse immunitaire satisfaisante chez les poulets de chair a été démontrée expérimentalement. À ce jour, trois vaccins basés sur la sous-unité VP2 ont été mis sur le marché dans certains pays, VP2 étant exprimé soit dans le système de baculovirus, soit dans *E. coli* ou dans la levure *Pichia pastoris* (Pitcovski *et al.*, 2003).

9.2.6. Vaccins à ADN

La vaccination à ADN consiste à injecter chez les oiseaux un plasmide contenant des séquences nécessaires à l'expression de la polyprotéine codée par le segment A ou de la protéine VP2 de l'IBDV. Le plasmide codant la polyprotéine semble donner une meilleure protection que le plasmide codant pour la seule VP2 (Fodor *et al.*, 1999 ; Li *et al.*, 2003). La co-administration de l'ADNc spécifique de l'IBDV et de l'interleukine-2 (Hulse *et al.*, 2004 ; Li *et al.*, 2004) ou de l'interleukine-6 (Sun *et al.*, 2005) a augmenté l'efficacité du vaccin.

L'injection de ce type de plasmide *in-ovo*, combinée à des plasmides codant des gènes d'immunité comme ces deux interleukines, et complétée par un rappel à l'aide d'un vaccin inactivé a montré expérimentalement son efficacité contre les vvIBDV (Etteradossi & Saïf, 2008 ; Park *et al.*, 2009) même si le programme vaccinal qui en résulte semble peu adapté à son utilisation en pratique. Enfin, des bactéries comme *Lactococcus lactis*, *Salmonella typhimurium* et *E. coli*, ont été utilisées pour administrer le vaccin à ADNc d'IBDV par voie orale. Le succès de cette méthode était variable car des difficultés dans la sécrétion ou la translocation de la protéine virale exprimée à travers la paroi cellulaire bactérienne pourraient être un facteur limitant (Li *et al.*, 2006; Mahmood *et al.*, 2007).

Article

**La bursite infectieuse aviaire en
Algérie : détection de virus réassortants
hautement pathogène**

(Edité, Infection, Genetics and Evolution 60 (2018) 48-57)

Travaux personnels

Contexte et déroulement de l'étude

Tous les travaux de recherche présentés dans cette thèse ont été réalisés au sein du laboratoire de virologie, immunologie et parasitologie avicole et cunicole (VIPAC) de l'agence nationale de sécurité sanitaire, de l'alimentation, de l'environnement et du travail- ANSES Ploufragan-France (Laboratoire de référence OIE sur la bursite infectieuse aviaire). Cette thèse a été financée par la bourse PNE (Programme National Exceptionnel) du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Algérien et par le département des Côtes d'Armor-Bretagne, France.

En 2000, dans le cadre d'une enquête épidémiologique menée par l'OIE, le laboratoire VIPAC de l'ANSES Ploufragan a caractérisé antigéniquement et génétiquement sept isolats d'IBDV Algériens sur la base de la séquence partielle de la protéine VP2. Les sept isolats sont apparentés aux souches hypervirulentes (vvIBDV), ce qui corrélait avec les observations de cas cliniques aigus rapportées à l'époque par les vétérinaires du terrain.

Le contrôle de l'IBD est basé essentiellement sur la vaccination des reproducteurs avec des vaccins vivants atténués et/ou inactivés et la vaccination des poulets de chair avec des vaccins vivants. Différents critères sont utilisés pour établir des programmes de vaccination et différentes souches vaccinales sont utilisées sans connaissance complète des caractéristiques des souches IBDV présentes dans les élevages ni sur le statut immunitaire des poussins avant vaccination.

Les travaux de recherche décrits ci-après ont été initiés suite à l'observation, en Algérie, de cas cliniques aigus de la bursite infectieuse aviaire dans les élevages avicoles en dépit de l'emploi des différents programmes de vaccination. Aussi, il a été constaté une absence de données concernant le profil des souches IBDV circulantes dans les élevages avicoles Algériens.

Travaux personnels

Dans ce contexte, une caractérisation génétique, antigénique et pathotypique des souches du virus de la bursite infectieuse aviaire circulantes en Algérie a été réalisée et l'étude s'est déroulée comme suit:

1. Environ 190 bourses de Fabricius (organe-cible du virus IBDV) ont été prélevées suite à la suspicion clinique de cas de maladie de Gumboro dans quelques élevages situés dans les régions Nord Centre d'Algérie: Alger, Bouira, Blida, Boumerdes, Tizi-Ouzou, Tissemsilt, Aïn Defla, Médéa, Tiaret et Tipaza. Ces prélèvements ont été effectués entre septembre 2014 et septembre 2015.

2. Les échantillons ont été broyés séparément et une extraction de l'ARN viral a été effectuée pour chaque isolat.

3. Dans un premier temps, nous avons réalisé une RT-PCR des segments A et B partiels (protéine VP2 et protéine VP1 partielles) ainsi qu'une étude phylogénétique sur les séquences obtenues afin d'obtenir un aperçu sur le profil des souches IBDV circulantes.

4. Par la suite, à partir des résultats de phylogénie sur séquences partielles des deux segments, nous avons sélectionné sept souches selon leur profil génétique pour l'étude du pouvoir pathogène sur poulets EOPS. De ce fait, une recherche de contaminants viraux dans les isolats sélectionnés a été réalisée par plusieurs passages sur œufs embryonnés EOPS par voie MCA, LA et IV ainsi que des passages sur cultures primaires d'hépatocytes et lymphocytes B.

5. Une caractérisation antigénique des souches sélectionnées a été réalisée à l'aide d'un test ELISA de capture antigénique mis au point au laboratoire VIPAC.

6. Enfin, un séquençage complet des deux segments A et B des souches sélectionnées a été réalisé par séquençage haut débit (ou NGS pour Next Generation Sequencing) et une étude phylogénétique a été effectuée à partir des séquences complètes obtenues.

Travaux personnels

Infectious bursal disease virus in Algeria: Detection of highly pathogenic reassortant viruses

Authors :

Mouna ABED^{1*}, Sébastien SOUBIES², Céline COURTILLON², François-Xavier BRIAND², Chantal ALLEE², Michel AMELOT⁴, Claire DE BOISSESON³, Pierrick LUCAS³, Yannick BLANCHARD³, Ali BELAHOUEL⁵, Redouane KARA⁶, Abdelhalim ESSALHI⁷, Soraya TEMIM¹, Djamel KHELEF¹ and Nicolas ETERRADOSSI^{2*}.

¹ Algiers High Veterinary School, Issad Abbes Street, Oued Smar - 16000 Algiers, Algeria.

² Avian and Rabbit Virology Immunology and Parasitology Unit (VIPAC), French Agency for Food, Environmental and Occupational Health Safety (ANSES), Zoopole – rue des Fusillés BP 53 - 22440 Ploufragan, France; OIE reference laboratory for Gumboro disease.

³ Viral Genetics and Biosecurity Unit (GVB), French Agency for Food, Environmental and Occupational Health Safety (ANSES), Zoopole – rue des Fusillés BP 53 - 22440 Ploufragan, France; OIE reference laboratory for Gumboro disease.

⁴ Experimental Poultry Unit (SELEAC), French Agency for Food, Environmental and Occupational Health Safety (ANSES), Zoopole – rue des Fusillés BP 53 - 22440 Ploufragan, France; OIE reference laboratory for Gumboro disease.

⁵ Veterinary Practice, Beni Slimane, 26000 MEDEA, Algeria.

⁶ Veterinary Practice, 02000 Chlef, Algeria.

⁷ Veterinary Practice, Al Attaf, 44000 Aïn Defla, Algeria.

*Corresponding authors at:

Algiers High Veterinary School, Issad Abbes Street, Oued Smar - 16000 Algiers, Algeria. Tel: +213 552 50 37 44 (M. ABED).

ANSES. Avian and Rabbit Virology Immunology and Parasitology Unit (VIPAC), rue des Fusillés BP 53 - 22440 Ploufragan, France. Tel: +33 2 96 01 62 22 (N. ETERRADOSSI).

Email addresses: m.abed@ensv.dz (M. ABED), nicolas.etterradossi@anses.fr (N. ETERRADOSSI)

Travaux personnels

Highlights:

- Samples collected in 2014-2015 during IBD outbreaks in Algeria were analyzed
- Typical and atypical vvIBDV strains, vaccine and reassortant strains were detected
- Reassortant strains had a vvIBDV-like segment A and a segment B of uncertain origin
- Pathogenicity of reassortant strains was comparable to that of reference vvIBDV
- There is continuous genetic evolution of IBDV strains in Algeria

1. Introduction

Infectious bursal disease (IBD) is an acute and highly contagious viral disease of young chickens. It is one of the most important avian viral diseases, due to the economic losses it causes to the poultry industry as a result of high mortality rates in its acute clinical form and of immunosuppression induced by subclinical infection (Etteradossi & Saif, 2013). The aetiological agent of IBD, infectious bursal disease virus (IBDV), is a non-enveloped virus belonging to the *Avibirnavirus* genus within the *Birnaviridae* family (Delmas *et al.*, 2004). Two serotypes of IBDV have been recognized and designated as serotype 1 and 2 (Ismail *et al.*, 1990; Jackwood *et al.*, 1985; McFerran *et al.*, 1980). All viruses that cause disease in chickens belong to serotype 1, whereas serotype 2 viruses are non-pathogenic for both chickens and turkeys (Etteradossi & Saif, 2013). IBDV genome consists of two segments of double-stranded RNA of approximately 3.2 and 2.8 kbp, named segment A and B, respectively (Müller *et al.*, 1979). The larger segment A contains two open reading frames (ORF). The smaller ORF encodes a non-structural polypeptide of 17 kDa known as VP5, a pro-apoptotic factor thought to facilitate viral release (Méndez *et al.*, 2017). The larger ORF encodes a polyprotein that is autoproteolytically cleaved into three polypeptides: pVP2 (48kDa), the precursor of the capsid protein (Da Costa *et al.*, 2002; Letzel *et al.*, 2007), VP3 (32 kDa), the ribonucleoprotein (Luque *et al.*, 2009), and VP4 (28 kDa) which is the viral protease responsible for polyprotein cleavage (Birghan *et al.*, 2000). Segment B encodes VP1, the 95 kDa RNA-dependant RNA-polymerase responsible for viral genome replication and synthesis of mRNA (Dobos *et al.*, 1979 and Macreadie & Azad, 1993). Both genome segments contribute to the pathogenicity of the most virulent strains of IBDV (very virulent IBDV or vvIBDV) (Escaffre *et al.*, 2013), that emerged in Europe in the late nineties (Etteradossi & Saif 2013). There is significant antigenic, immunogenic, and pathogenic variation between IBDV strains which contribute to determine disease outcome. Controlling IBD and its associated immune suppression is critical to the broiler industry. This control is

Travaux personnels

achieved by vaccinating breeder hens with conventional live attenuated and/or inactivated IBD vaccines, and by the use of live IBD vaccines in broiler chicks, layers or young pullets to provide active protection against IBDV (Müller *et al.*, 2012). Both strategies are often combined. Different criteria are used to establish vaccination programs, and different vaccine strains are used without a complete knowledge of the characteristics of the IBDV strains prevalent in the field. In Algeria, IBD was first observed in poultry production after the emergence of the virus in Europe in the late 1980's (Allamigeon et Comte, 2001). The presence of vvIBDV in Algeria was first suspected in 2000 when the VP2 gene of seven IBDV isolates was partially sequenced (OIE report to the Algerian OIE delegate, unpublished). In GenBank, there are some other reports of IBDV partial sequences for VP2 genetically related to vvIBDV originating from Algeria (Boudaoud, A., unpublished), but reports describing these strains and especially their phenotype have not been published yet. Currently, despite some biosecurity and vaccination measures implemented at farm level, IBD cases are still often diagnosed, mostly on a clinical basis (Alloui & Sellaoui, 2015), and the molecular epidemiology of Algerian IBDV strains remains largely unknown. In order to get a better understanding of the current epidemiological situation, this study was designed to characterize the genetic, antigenic and pathotypic diversity of some IBDV isolates collected between September 2014 and September 2015 in comparison with isolates from the 2000 study.

2. Materials and methods

2.1 Ethics statement

All animal experiments were performed in agreement with national regulations (authorization by French Ministry for higher education and research under permit number APAFIS#4945-2016041316546318 v6) on animal welfare and after approval of the protocols by Anses' ethical committee, registered at the national level under number C2EA-016.

2.2 Samples

Bursal samples (n=190) were collected between September 2014 and September 2015 from 35 broiler chicken flocks suspected to be infected with IBDV. These flocks were located in the major poultry production provinces from the North and the Center of Algeria.

Travaux personnels

All bursal samples showed lesions of congestion, edema, haemorrhage, hypertrophy or atrophy. They were stored at -20 °C until further analysis in the laboratory. Background information for the studied samples is documented in Supplementary table 1.

2.3 Reference viruses

Two reference viral strains were used in this study: strain F52/70 (Bygrave and Faragher, 1970) as reference for classical virulent strains, and strain 89163 (Etteradossi *et al.*, 1992) as reference for vvIBDV.

2.4 Previously collected Algerian IBDV isolates

In 1999, the authors' laboratory (ANSES Ploufragan, acting as one of the OIE reference laboratories of IBD) participated in a world-wide survey of IBDV isolates collected during acute IBD outbreaks (Etteradossi *et al.*, 2004). From Algeria, seven isolates were collected in 2000. These were characterized by antigen-capture ELISA (AC-ELISA) and partial sequencing of their VP2 gene (Report to the OIE delegate of Algeria, unpublished). These strains were included in the phylogenetic analysis in this study (Supplementary table 2).

2.5 Sample preparation

Each virus suspension was prepared separately starting from Bursae of Fabricius of each flock as previously reported (Etteradossi *et al.*, 1992). The viral suspension was treated with chloroform (volume to volume) by stirring overnight at 4 °C to inactivate any enveloped viral contaminants possibly present in the samples.

2.6 Reverse transcription-PCR and partial segment sequencing

Viral RNA was extracted from 140 µL of viral suspension using the QiAMP Kit RNA Mini Kit (Qiagen) as recommended by the manufacturer. Reverse transcription, PCR amplification using chimeric primers and sequencing of viral segments A and B were performed as previously described (Le Nouën *et al.*, 2006), resulting in 514 base pairs (from position 744 to 1180) and 544 base pairs (from position 297 to 1749) fragments for segments A and B, respectively.

Travaux personnels

2.7 Full-length sequencing of genomic segments by next-generation sequencing (NGS)

One milliliter of IBDV viral suspension was centrifugated at 12 000 g for 10 minutes. Supernatant was collected, filtered through a 0.22 µm filter (Millex-GV filter unit, Merck-Millipore) and 250 µL of filtrate were incubated for one hour at 37 °C with 250 Units DNase I and 10 µg RNase to degrade all non-encapsidated nucleic acids. Encapsidated RNA was then extracted using Trizol LS Reagent (Life Technologies) according to the manufacturer's instructions.

Complementary DNA (cDNA) libraries were prepared using the Ion Total RNA-Seq Kit (Life Technologies, Carlsbad, California, USA) according to the supplier's instructions. The cDNA libraries were sequenced using the Ion Proton Sequencer and an Ion PI Chip v2 (Life Technologies).

Reads were cleaned with the Trimmomatic 0.36 software, then a Bowtie 2 (version 2.2.5) alignment was performed with reads on local nt database to identify virus references. The IBDV references with the highest number of matching reads were used for an alignment with bwa (0.7.15-r1140). The reads from this second alignment were collected then down-sampled to fit a global coverage estimation of 80x and were submitted to the SPAdes 3.10.0 *de novo* assembler. The *de novo* contigs were then submitted to BLAST on a local nt database, the best matches were selected for a bwa alignment. Finally, the *de novo* assemblies and the alignment on the references were compared and the strict identities of the *de novo* and aligned sequences were assessed for validation of the final sequences.

2.8 Phylogenetic analyses

Newly obtained sequences were analyzed with BLAST in the GenBank database and the closest available nucleotide sequences, as well as sequences representative of the previously recognized genetic groups or previously described as reassorted IBDV isolates (Cui *et al.*, 2013; Gao *et al.*, 2007; Jackwood *et al.*, 2011; Jackwood *et al.*, 2016; Kasanga *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2017; Le Nouën *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2015; Lu *et al.*, 2015; Soubies *et al.*, 2016; Wei *et al.*, 2006; Wei *et al.*, 2008; Xia *et al.*, 2008) were retrieved for phylogenetic analysis (Supplementary table 3). Nucleotide and amino acid sequences were aligned using the ClustalW algorithm (Mega software version 7). All phylogenetic analyses were performed on nucleic acid sequences, using the neighbor-joining method, and the robustness of the topology

Travaux personnels

of the resulting trees was analyzed by the bootstrap method with 1000 replicates. Bootstrap values lower than 75% were considered non-significant.

2.9 Antigenic characterization

Antigen-capture ELISA (AC-ELISA) was used to determine antigenic profiles of isolates as previously reported (Eterradossi *et al.*, 1997). Briefly, IBDV particles from bursal homogenates were captured in comparable amounts using an anti-IBDV polyclonal serum. Detection was performed with a panel of IBDV-specific neutralizing monoclonal antibodies (mAbs) that recognize epitopes located in the VP2 hypervariable domain. The binding of the mAbs to the virus particle was expressed as a percentage based on the binding of a reference reagent. As previously reported, the reactivity of the mAbs was considered negative, reduced or positive if the percentages were lower than 15%, comprised between 15% and 25%, or equal or higher than 25%, respectively.

2.10 Search for viral contaminants, cloning by limiting dilution and egg titration

The strains selected for the experimental study were tested for viral contaminants. For strains 150136, 150131 and 150127, after neutralization of the virus suspension with anti-IBDV serum, three serial passages were performed on specific pathogen-free (SPF) chickens embryonated eggs (intra-vitelline, allantoic and chorioallantoic membrane routes) as well as on primary chicken embryo hepatocytes cultures.

For strains 150128, 150133, 150144 and 150124, pure IBDV stocks were achieved by performing three serial passages (cloning by limiting dilution) on primary chicken bursal B lymphocytes cultures prepared as previously described (Soubies *et al.*, 2017). The absence of additional viral contamination in these strains was confirmed by lack of sero-conversion on infected SPF chickens 3 weeks after infection (see section 2.12).

Viral stocks identified as non-contaminated were titrated on 9 to 11 day-old embryonated SPF eggs inoculated onto the chorioallantoic membrane (CAM). Viral titers were calculated using Reed and Munch formula and expressed as median embryo infectious doses (EID₅₀) (Reed and Munch, 1938).

2.11 Evaluation of pathogenicity in chickens

Pathogenicity was evaluated in 6-week-old SPF chickens (Anses-Ploufragan, France) in 3 separate experiments. Chickens were weighed and distributed into groups of comparable sex and weight (number of birds per group are mentioned in table 4). Individual chickens were

Travaux personnels

identified by coloured rings on the legs. Blood from at least 5 chickens per group was sampled prior to inoculation to confirm seronegativity for IBDV. On the following day, each bird was inoculated via the nasal route with 10^5 EID₅₀ of the studied virus. All experimental groups were maintained in biosafety level 2 isolators under negative pressure for infected groups and under positive pressure for the non-infected control group. The birds were monitored daily for 21 days; clinical signs were quantified until 10 days post inoculation (DPI) using a previously described daily symptomatic index (Le Nouën *et al.*, 2012). Cumulated mortality rates were calculated at 21 DPI.

Bursae were sampled at 4, 10 and 21 DPI. At each date, at least 5 birds per group were weighed and humanely killed by electronarcosis followed by bleeding, cervical dislocation and necropsy. Bursae were weighed for the calculation of the bursa-to-body weight ratio (b/B). All surviving birds at the end of the experiment were humanely killed and sampled for final examination of the bursae.

2.12 Serological analyses

IBD serological status was determined on the day before challenge and at 21 DPI in a viral neutralization assay performed in chicken embryo fibroblasts, using IBDV serotype 1 strain CT as an antigen, as described previously (Etteradossi *et al.*, 1997).

In order to confirm the absence of viral contaminating agents in the inocula, sera collected at 21 DPI were tested for seroconversion using inhibition of haemagglutination tests (for avian paramyxovirus 1 and egg drop syndrome virus), agar-gel immunodiffusion tests (for influenza virus, infectious laryngotracheitis virus, adenovirus CELO and Marek's disease virus), and commercial ELISA kits (for infectious bronchitis virus [IDEXX IBV, reference 99-09262, Westbrook, ME, USA], avian reovirus [REO ELISA, reference FS6175, Biocheck, Hounslow, UK] and Chicken anemia virus [IDEXX CAV, reference 99-08702]).

2.13 Statistical analyses

The statistical differences between groups were evaluated using the Kruskal-Wallis test for quantitative values and clinical scores and with the χ^2 test for comparisons of percentages; all tests were implemented with the R software (<https://cran.r-project.org/>). A value of $P < 0.05$ was considered significant.

Travaux personnels

3. Results

3.1. RT-PCR detection of IBDV

Out of the 35 flocks investigated, positive RT-PCR results (Supplementary table 1) were obtained for 22 samples (63% of flocks). Out of these, the partial sequences of both segments were obtained for 19 samples. For two samples, only segment A partial sequence could be determined; for one sample, only segment B partial sequence could be determined.

3.2 Phylogenetic analyses based on partial sequences of segments A and B

The nucleotide sequence data generated in this study are available in the GenBank database and their accession numbers are shown in Supplementary table 1.

Phylogenetic trees based on the partial nucleotide sequences of segments A and B are shown in figure 19. The analysis of segment A revealed the distribution of the 19 studied isolates into two groups: the first group included 16 isolates which clustered with the Asiatic and European vvIBDV and with Algerian IBDV sequences determined in 2000 (group I, bootstrap value 98%). These isolates either had a strict amino acid identity with vvIBDV reference strain 89163, or (isolates 150128 and 150133) exhibited a single amino acid change G254S (Supplementary figure 1). The second group of recent Algerian isolates included three isolates that clustered with the IBDL vaccine strain (99% bootstrap value, group II) and exhibited a strict amino acid identity with this vaccine strain.

The phylogenetic analysis of segment B revealed a distribution of the newly-determined sequences into three groups. The first group included ten Algerian isolates (group I) associated with European and Asiatic vvIBDV, and with Algerian strains isolated in 2000 (bootstrap 100 %). Amino acid comparison revealed a strict identity of group I isolates with reference vvIBDV strain 89163, except for strains 150123 and 150130, which exhibited mutations K162N and A163V, respectively (Supplementary figure 2). Additionally, isolates 150133 and 150128 (group Ia) formed a significant subcluster within group I, together with the recently described Algerian strain “399 Algeria” (Michel & Jackwood, 2017), as they diverged from all other subgroup I strains (bootstrap 96%). The two group Ia strains exhibited the T174S mutation as compared with 89163. In the second group, three Algerian isolates – the same as identified in segment A tree – proved significantly related with the IBDL vaccine (group II, bootstrap value 80%), with which they had a strict amino acid identity

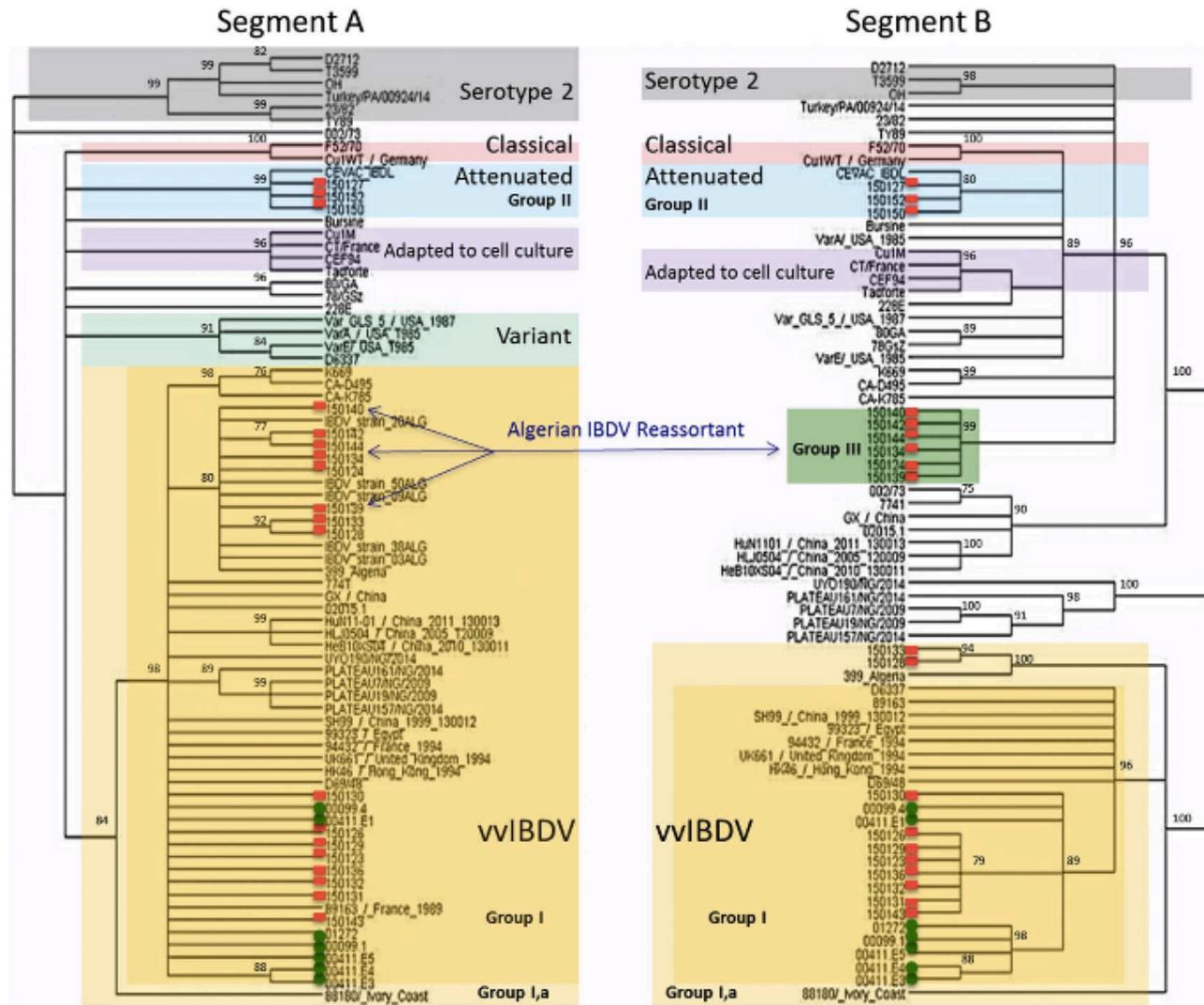


Figure 19: Condensed consensus phylogenetic trees deduced from the partial sequences for segment A (left) and segment B (right) of Algerian and reference IBDV strains using the neighbor-joining method. Main genetic groups are highlighted by colour-boxes. Algerian IBDV strains from 2000 are marked by green circles. Algerian IBDV strains isolated in this study are marked by red squares. Only branches supported by a bootstrap value >75% (values mentioned) are displayed. The trees are based on 1000 bootstrap replicates. GenBank accession numbers are listed in supplementary Tables 1 and 3

Travaux personnels

(Supplementary figure 2). Finally, the third group of newly-determined Algerian sequences included six isolates, sharing a common geographic origin and forming a distinct cluster (group III, bootstrap value 99%) that could not be linked to any previously published reference sequence.

In summary, genetic analyses based on partial sequences for segment A and B revealed four groups for Algerian IBDV isolates that are i) viruses related to vvIBDV for segments A and B, including those isolates collected in 2000, ii) viruses, like 150128 and 150133, whose segment A is related to vvIBDV and whose segment B is more distantly related to vvIBDV, iii) viruses related to vaccine strains and iv) potential reassortant viruses, such as 150124 and 150144, with a segment A genetically related to vvIBDV and a segment B of undetermined origin.

3.3 Complete sequence analysis

The complete consensus sequences of both segments A and B of IBDV Algerian isolates 150127, 150128, 150133, 150136, 150124 and 150144 were determined by NGS (see Accession Numbers of complete genome sequences in Supplementary table 1). The phylogenetic analyses further confirmed the genetic relatedness defined based on partial sequences and excluded any indication of recombination for the studied isolates (supplementary figure 3). Isolate 150136 segments A and B clustered with typical European vvIBDV. In segment A, isolate 150136 only exhibited the A990V change in its polyprotein and one specific change (E120K) in VP5 compared to reference vvIBDV (Table 1). In segment B, this isolate exhibited three amino acid (aa) changes in VP1 compared to reference vvIBDV (Y243F, T329S and T859I, Table 2). Segments A of isolates 150128 and 150133 appeared related to European vvIBDV. Their segments B were also related to European vvIBDV, and yet were confirmed to belong to a distinct cluster (supplementary figure 3). These two isolates exhibited only one aa change in segment A at position G254S of the polyprotein (Table 7). Seven aa changes were observed in VP5 compared with 89163, but all those were also seen in other Algerian isolates (Table 1). In segment B four changes were observed in both VP1 sequences (V4I, T295A, A391T, D393E, V697A); one change (I385V) was only observed in isolate 150128 (Table 2). Isolate 150127 segments A and B clustered with classical strains (supplementary figure 3). Finally, segment A of 150124 and 150144 clustered with the group of European and Asiatic vvIBDV. Segment A-encoded proteins displayed very few changes compared with reference vvIBDV, with one change specific to each VP5 sequence (Table 7); in the polyprotein, one and two changes were observed for

Travaux personnels

150144 and 150124, respectively (Table 7). Their segments B were related to a large group including serotype 2, classical, attenuated and variant strains. Although classical, attenuated and variant strains clustered together, the remaining segment B sequences, belonging either to serotype 2 reference strains or to interserotypic reassortants, were not supported by a significant bootstrap value: as a consequence, strains 150124 and 150144 segment B could not be linked to any reference sequence (supplementary figure 3). The aminopeptidic sequence of this segment B (group III) revealed the absence of an amino acid triplet presented as characteristic of the European vvIBDV (Gao *et al.*, 2014) (positions 145T, 146D and 147N), replaced by a triplet (145N, 146E, 147G) also found in classical, variant or serotype 2 strains IBDV. Their VP1 sequence only differed by 4 to 5 amino acid to serotype 2 strain 23/82 VP1 (Table 6). Three of these changes were common to both isolates: T12S, T123A and L698P. One (Q543R) and two (A24T and E217G) additional changes were observed for 150124 and 150144, respectively.

Travaux personnels

Table 4: Amino acids differences in VP2 complete sequence between Algerian strains and reference strains. Grey boxes show aa identity with 89163

Strain	Amino acids differences in VP5 at position													Amino acids differences in polypeptide at position																															
	8	14	26	34	40	45	74	76	100	112	118	120	133	134	217	222	242	254	256	257	270	294	299	300	334	451	453	517	521	541	588	680	685	702	715	751	923	951	990	1005					
89163	N	E	H	N	S	R	F	W	C	A	Y	E	W	H	S	A	I	G	I	L	A	I	S	E	A	L	R	Y	A	I	E	Y	N	K	S	D	R	I	A	A					
150136	.	K	G	.	H	K	V	.	
150124	H	K	Y	.	T	.	.	G	G	V	H	H	V	.	
150144	.	K	Y	.	T	.	.	G	G	V	H	.	.	Y	R	.	
88180	.	.	.	H	.	G	I	.	.	.	H	.	.	.	Q	M	.	L	N	Q	V	K	V	.
150133	.	K	Y	.	T	.	.	G	G	V	H	S
150128	.	K	Y	.	T	.	.	G	G	V	H	S
Irwin Moulthrop	K	.	.	.	G	I	H	.	R	.	.	P	.	.	V	.	.	L	N	.	.	I	.	H	.	V	K	C	K	.	.	P	H	K	T		
150127	K	.	.	.	G	I	H	.	R	.	L	P	V	.	V	.	T	.	N	.	.	I	K	.	T	V	.	C	K	.	.	P	H	K	T	

Table 5: Amino acids differences in VP1 complete sequence between vvIBDV Algerian related strains and reference strain 89163. Grey boxes show aa identity with 89163

Strain	Amino acids differences in VP1 at position														
	4	55	147	219	243	295	329	385	391	393	576	595	697	859	
89163	V	R	T	D	Y	T	T	I	A	D	T	C	V	T	
150136	F	.	S	I	
88180	.	K	S	N	F	.	.	.	T	E	A	S	.	.	
150133	I	A	.	.	T	E	.	.	A	.	
150128	I	A	.	V	T	E	.	.	A	.	

Travaux personnels

3.4 Antigenic profiling

The antigenicity of four Algerian isolates selected as representative of the four genetic groups discussed previously is characterized in table 7 and compared to reference strains F52/70 (classical), 89163 (typical vvIBDV).

The antigenic profile of isolates 150124 and 150136 revealed a lack of binding of mAbs 3 and 4 and binding of all other mAbs, as expected for typical vvIBDV such as 89163 (Etteradossi *et al.*, 1997). The antigenic profile of the 150128 isolate was also evocative of vvIBDV (lack of binding of mAbs 3 and 4) but furthermore included no reactivity with mAb 5, consistently with the antigenic profiles previously described for several European (Martin *et al.*, 2007) and Egyptian vvIBDV (Etteradossi *et al.*, 2004) also harbouring the same G254S amino acid change (see Supplementary figure 1). Finally, isolate 150127 and strain F52/70 reacted with all mAbs tested, as reported for F52/70 (Etteradossi *et al.*, 1997) and strain IBDL (Etteradossi *et al.*, 2004). This result was indicative of the classical antigenic profile of these strains.

3.5 Pathogenicity

All birds were seronegative for IBD-antibodies prior to inoculation and anti-IBD antibodies were only detected in inoculated groups at 21 DPI. Neither morbidity, mortality or lesions were observed in mock-inoculated control birds following inoculation.

In animal experiment 1, the pathogenicity of strains 150127 strain (related to vaccine strain IBDL) and 150136 (related to European vvIBDV) was compared with that of F52/70 (classical strain) and 89163 (vvIBDV strain). Four days after inoculation, mortality in groups challenged with 89163 and F52/70 reached 15 % and 10 %, respectively. Infection with Algerian strains (150127 and 150136) did not induce any mortality. Clinical signs were significantly more severe in groups challenged with strains 89163, F52/70 and 150136 (maximum mean clinical scores of 1.4, 1.2 and 0.98, respectively) than in the group challenged with strain 150127 (maximum mean clinical score of 0.4), (Figure 120, A). At 21 DPI, the mean bursa-to-body-weight ratio (b/B) in the groups challenged with strains 89163, F52/70 and 150136 were significantly lower than in the control group (mean b/B ratio ranging from 0.7 to 0.8 ‰ *versus* 3 ‰ for NI). The group challenged with the 150127 strain displayed an intermediate b/B ratio (b/B ratio 1.06 ‰, $P>0.05$) (Table 8).

In animal experiment 2, the pathogenicity of Algerian isolates 150128, 150133 and 150131 (related to vvIBDV) was evaluated and compared with strain 89163. At 4 DPI, groups

Travaux personnels

Table 6: Amino acid differences in VP1 complete sequence between 150124 and 150144 reassortant Algerian strains and reference strains. Grey boxes show aa identity with 23/82

Strain	Amino acids differences in VP1 at position												
	4	12	13	24	123	148	217	508	511	543	546	698	759
23/82	V	T	K	A	T	L	E	K	S	Q	P	L	K
CT	I	S	T	.	A	.	.	R	R	.	L	P	.
CEF94	I	S	T	.	A	.	.	R	R	.	L	P	.
VarGLS/USA1987	I	S	.	.	A	P	.	R	R	.	.	P	R
150124	.	S	.	.	A	R	.	P	.
150144	.	S	.	T	A	.	G	P	.

Table 7: Antigenic characterization of selected Algerian IBDV isolates (150124, 150127, 150128 and 150136) compared to the antigenicity of IBDV strains Faragher 52/70 (classical serotype 1), 89163 (typical vvIBDV), in Antigen-Capture ELISA (AC-ELISA)

The reactivity of each mAb is expressed as percent reactivity of a polyclonal reagent that binds to all strains. Grey color indicates reduced or absent binding of the considered mAbs. The results are the mean from two independent experiments

IBDV strain	% AC-ELISA reactivity of							
	mAb1	mAb3	mAb4	mAb5	mAb6	mAb7	mAb8	mAb9
F52/70	68	82	78	51	101	101	100	70
89163	71	2	9	65	120	119	81	55
150124	79	4	25	89	147	137	114	55
150127	74	64	80	33	106	98	95	64
150128	42	1	4	0	107	91	59	65
150136	68	3	15	68	134	125	100	62

Travaux personnels

challenged with 89163 and 150131 strains presented 27 % and 40 % of mortality, respectively. However, the groups challenged with 150128 and 150133 strains presented a significantly lower mortality (5 % in both groups, $p < 0.05$).

Clinical signs were similarly severe (maximal clinical scores ranging from 1.2 to 1.9) in all challenged groups, which proved significantly different from the control group. The group challenged with strain 150131 showed a higher symptomatic index at 3, 4 and 5 DPI (Figure 20, B). The study of b/B ratios at 21 DPI revealed a comparable and statistically significant bursal atrophy (mean b/B ranging from 0.5 to 0.7 ‰) in the four challenged groups (150128, 150133, 150131 and 89163) when compared with the un-inoculated control group (Table 8).

In animal experiment 3, the pathogenicity of the Algerian reassorted strains 150144 and 150124 (segment A: vvIBDV and segment B: undetermined origin) was evaluated and compared with strain 89163. Mortality at 4 DPI reached 46 % (89163), 42 % (150144) and 55.5 % (150124). Clinical signs induced by these reassortant viruses were severe and not significantly different from 89163. However, the 150144 strain presented a higher mean symptomatic index at 4 DPI (Figure 20, C). A severe bursal atrophy, with a mean b/B ratio ranging from 0.4 and 0.6 ‰, was observed at 21 DPI in all challenged groups (Table 8).

Serological analysis in the inoculated chickens confirmed seronegativity to IBDV prior to inoculation and presence of anti-serotype 1 IBDV neutralizing antibodies 21 DPI, in all three experiments (Table 8).

Travaux personnels

Table 8: Pathogenicity analyses (mean BBW ratio and cumulated mortality) of Algerian IBDV strains in 6-week-old SPF chickens, comparing with classical virulent strain F52/70 and/or the typical vvIBDV strain 89163 as reference controls.

		Animal experiment number														
		1					2					3				
		Control	F52/70	89163	150127	150136	Control	89163	150131	150128	150133	Control	89163	150144	150124	
Groups (IBDV challenge strain*)	Genetic type	Segment A	Classical	vvIBDV	vaccine	vvIBDV		vvIBDV	vvIBDV	vvIBDV	vvIBDV		vvIBDV	vvIBDV	vvIBDV	
		Segment B	Classical	vvIBDV	vaccine	vvIBDV		vvIBDV	vvIBDV	vvIBDV	vvIBDV		vvIBDV	Undetermined origin	Undetermined origin	
Chickens /group		20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	10	15	18	19	
Parameters	Mean BBW ratio (%) ± SD***	At 4 DPI	4.3±0.7 ^a	4.8±1.02 ^a	3.4±0.8 ^a	4.2±1.9 ^a	5.2±0.8 ^a	3.6±0.5 ^a	3.7±0.9 ^a	2.7±0.6 ^a	3.6±1.4 ^a	3.9±0.8 ^a	2.4±0.3 ^a	3.7±1.1 ^a	4.2±0.1 ^a	3.5±0.8 ^a
		At 10 DPI	3.4±0.4 ^a	0.9±0.2 ^b	0.9±0.06 ^b	1.4±0.1 ^c	1.2±0.2 ^c	3.7±0.1 ^a	0.9±0.2 ^b	0.9±0.1 ^b	1.01±0.2 ^a	0.9±0.1 ^b	ND**	ND**	ND**	ND**
		At 21 DPI	3.0±0.5 ^a	0.8±0.1 ^b	0.7±0.2 ^b	1.06±0.2 ^c	0.8±0.2 ^b	2.6±0.4 ^a	0.5±0.1 ^b	0.6±0.1 ^b	0.6±0.2 ^b	0.7±0.1 ^b	3.4±0.2 ^a	0.4±0.1 ^b	0.5±0.1 ^b	0,6±0,1 ^b
	Cumulated mortality (%)		0 ^a	10 ^a	15 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	27 ^b	40 ^c	5 ^a	5 ^a	0 ^a	46 ^b	42 ^b	55.5 ^b
	Anti-serotype 1 IBDV Mean log2 VN titre ± SD at 21 DPI		<3.3	12.3±1.6	13.8±1.4	12.8±1.2	12.5±1.9	<3.3	13.4±1.8	12.4±1.6	13.8±1.8	13.5±2.2	0	13.6±2.4	13.2±1.9	13.7±1.7

*: Chickens received 10⁵ EID₅₀ in 0.1 ml of the virus by the intranasal route

** : Not done

***: Mean value BBW ratio (%) ± standard deviation

Values with the same superscript letter do not differ significantly according to the χ^2 test (mortality) or the Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post-test (other parameters) at the P≤0.05 confidence level.

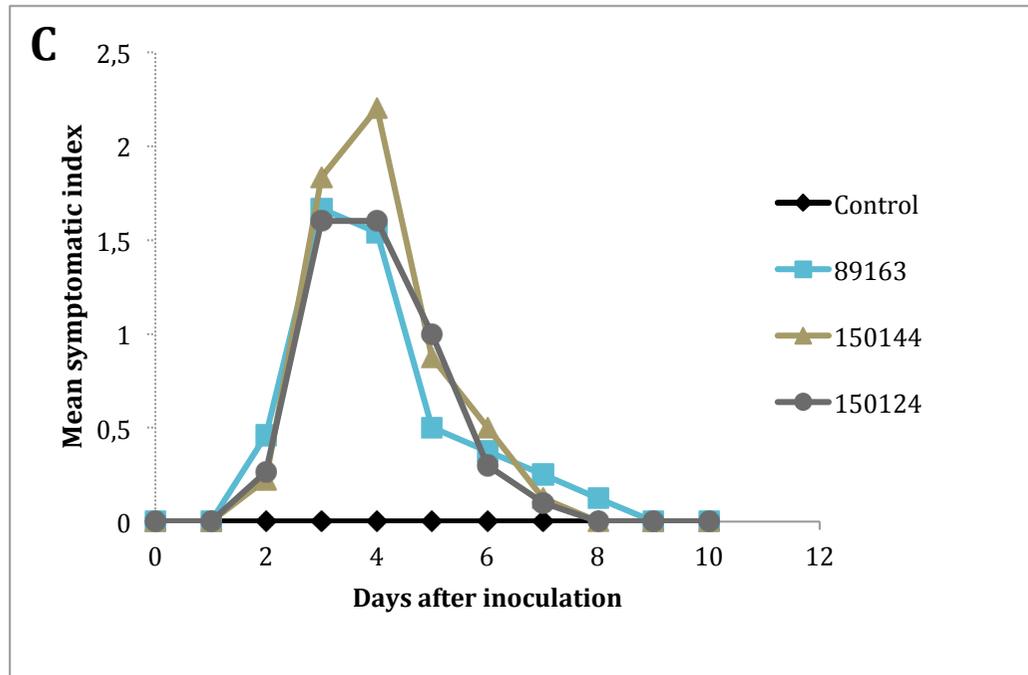
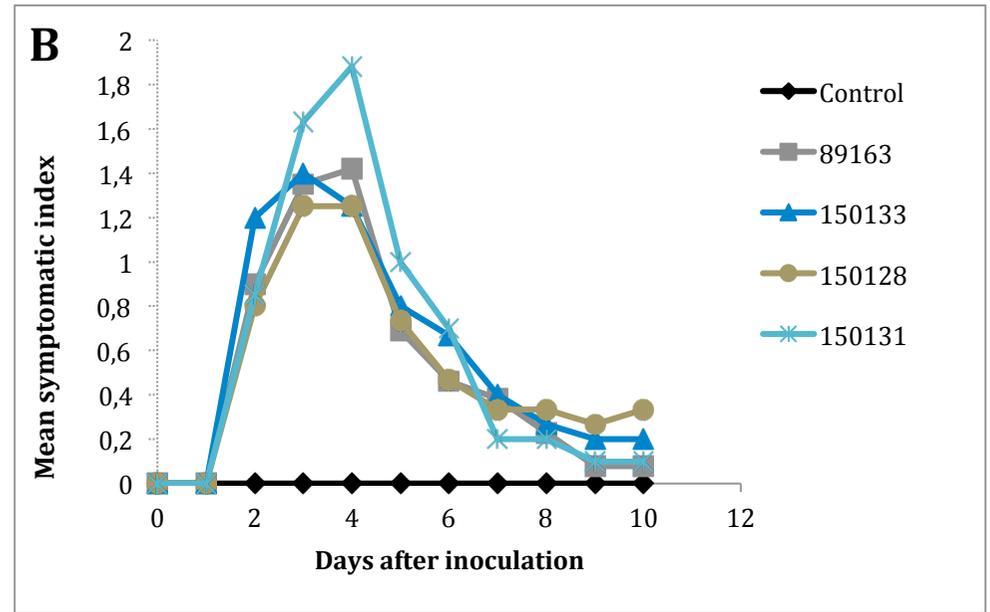
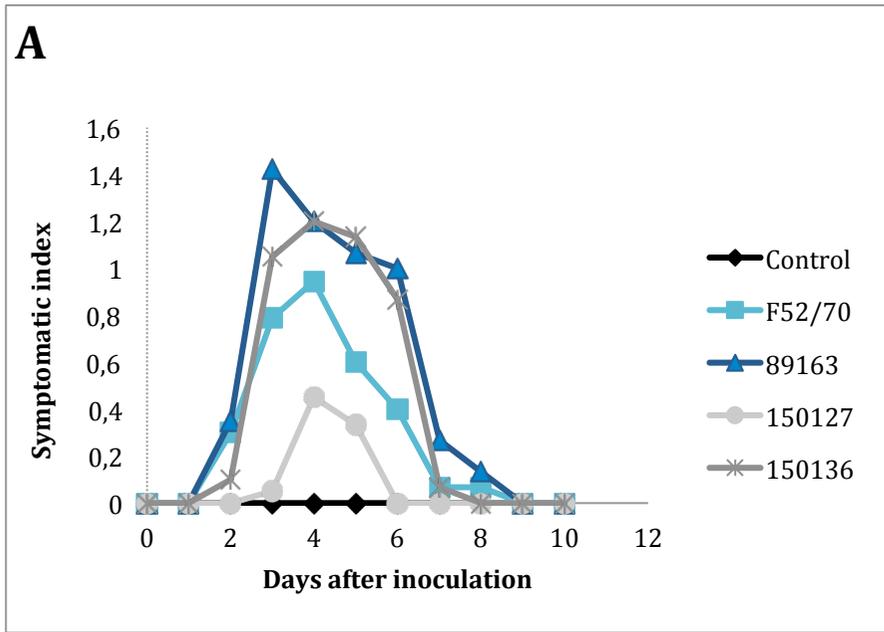


Figure 20: Mean individual symptomatic index for surviving chickens from 1 to 10 DPI for animal experiments 1 (A), 2 (B) and 3 (C).

Multiple comparisons of symptomatic indexes were performed with the Kruskal-Wallis test followed by «Dunn's post-test». Different letters indicate significant difference ($P < 0,05$).

Travaux personnels

4. Discussion

Since it was first reported in Algeria, IBDV has acquired an endemic status despite the implemented prophylactic measures. IBD is often diagnosed clinically (Alloui & Sellaoui, 2015) and the molecular epidemiology of Algerian IBDV strains remains unknown, in spite of the report to OIE around 2000 about the detection of viruses genetically related to vvIBDV in Algeria (OIE, not published). In an attempt to get an overview of the genetic evolution of IBDV in Algeria during the last twenty years, seven samples collected around 2000 as well as samples from thirty-five broiler chicken flocks recovered between September 2014 and September 2015 in different geographic areas of Algeria were analyzed for IBDV diagnosis and phylogenetic analyses for segment A and B. Antigenic and pathogenic characterization was also performed for selected isolates from 2014-2015. Our results reveal a broad genetic and phenotypic diversity of IBDV in Algeria, with namely, i) ongoing circulation of viruses related to European and Asian vvIBDV since at least 1999, ii) the current circulation of viruses still closely related yet distinct from European vvIBDV, iii) the recent detection of pathogenic reassortant viruses.

Thirteen of the investigated cases tested negative for IBDV by RT-PCR. The absence of IBDV in those samples could be explained either by a late sampling of atrophic bursae after virus clearance, so that the virus load or RT-PCR sensitivity were too low to allow detection, or by a clinical diagnosis based on bursal lesions, that could have been due to non-IBDV etiological agents such as mycotoxins (Terao *et al.*, 1978), *E.coli* (Nakamura *et al.*, 1986), infectious anemia disease virus (Bougiouklis *et al.*, 2007), Marek's disease virus (Aly *et al.*, 1996; Jakowski *et al.*, 1969), avian adenovirus (Grimes and King, 1977), avian lymphoid leucosis (Peterson *et al.*, 1966) or reticuloendotheliosis virus (Payne, 1998). For three other samples, the lack of amplification of one segment only may be explained by a low viral load in the bursae, however mutations preventing the annealing of the RT-PCR primers cannot be excluded.

Three of the 2014-2015 isolates were genetically closely related to the IBDL vaccine strain, and isolate 150127 indeed showed a pathogenic profile consistent with an intermediate plus vaccine strain (low morbidity, absence of mortality clear bursal atrophy). The detection of vaccine-related isolates was not unexpected because this vaccine is broadly used in this area, and its use was specifically reported in two out of the three studied cases.

Phylogenetic analyses of the newly determined sequences revealed eight viruses related to European and Asiatic vvIBDV for both segments. Such viruses thus have been circulating in Algeria since at least 1999. This is consistent with clinical descriptions of pathogenic IBD

Travaux personnels

cases in Algeria since the late 1980s. The vvIBDV strains are thought to have spread from Western Africa in the mid-eighties (Etteradossi *et al.*, 1999; Hon *et al.*, 2006; Owoade *et al.*, 2004). Spread towards Algeria could have occurred then, through wild migratory birds (Ogawa *et al.*, 1998; Jeon *et al.*, 2008) or by commercial exchanges. Interestingly, although closely genetically-related to European and Asian vvIBDV for both their genome segments, two of these isolates showed varying degrees of pathogenicity: Isolate 150131 was shown to exhibit comparable pathogenicity (mortality, morbidity and bursal atrophy) as the European reference vvIBDV strain 89163 in SPF chickens. In contrast, no mortality was observed with isolate 150136 in spite of morbidity and bursa atrophy that were comparable to those induced by reference strains. The reduced pathogenicity of isolate 150136 could be due to attenuating mutations observed in either genomic segment. For instance, the A990V mutation in its polyprotein (segment A) is located in the C-terminal region of VP3, close to the extremity which was shown to activate the VP1 polymerase (Garriga *et al.*, 2007). A recombinant, cell-culture adapted IBDV strain, Gt, showed impaired replication when the V990A change was introduced into VP3 (Wang *et al.*, 2010). How the reverse change (A990V as seen in 150136) would affect a vvIBDV is not known. Three changes were also found in the VP1 protein sequence of isolate 150136: Y243F, T329S and I859T. Finally the E120K change, unique to the VP5 protein of 150136 is also observed. This mutation is not located in the interaction domain of VP5 with VDAC2 (Li *et al.*, 2012) nor in its phosphoinositide interaction domain (Mendez *et al.*, 2015), and its impact on the pathogenicity of isolate 150136 is difficult to anticipate. Using reverse genetics to introduce these five changes into a typical vvIBDV backbone, would help understand their respective contribution to the low pathogenicity of isolate 150136.

Isolates 150128 and 150133 represented a second type of viruses that was identified in this study and appear very similar to the recently published “399 Algeria” partial sequences (Michel & Jackwood, 2017). Complete sequence analysis of isolates 150128 and 150133 showed that although their segments A exhibited a single amino acid change G254S (Table 4) compared to 89163 vvIBDV of reference, already described in some African and European vvIBDV (Martin *et al.*, 2007; Nwagbo *et al.*, 2016; Owoade *et al.*, 2004), their segment B are related but nevertheless significantly different from vvIBDV. Another segment B cluster similarly “related yet different” from vvIBDV was already described with IBDV strain 88180 from Ivory Coast (Etteradossi *et al.*, 1999; Owoade *et al.*, 2004) and was suggested to be a representative of segments B that circulated in Africa a short time before the emergence of vvIBDV. Isolates 150128 and 150133 originate from two Algerian regions hundreds of

Travaux personnels

kilometers apart, indicating that similar viruses are present throughout the country. Interestingly, while the mortality they induce in SPF chickens was significantly reduced as compared with strain 89163, morbidity and bursal atrophy were similar to those of strain 89163. Among mutations observed in the 150128 and 150133 isolates, the V4I change, found in their VP1 protein, was previously shown to be responsible for the attenuation of vvIBDV strain HLJ0504 *in vivo* (Yu *et al.*, 2013) and might therefore contribute to their attenuated phenotype.

The last type of viruses identified in this study is illustrated by a significant proportion (6 out of 19) of the recent isolates analyzed, while none was detected in the 2000 isolates. All these isolates originate from the region of Medea. Their segment A appeared closely related to European and Asian vvIBDV while their segment B could not be related to any reference sequence. These viruses are therefore potential naturally occurring reassortants. Although the precise origin of their segment B cannot be established with certainty, they cluster within a group containing segments B from classical, attenuated and variant viruses while being significantly distinct from those, similarly to segments B from viruses belonging to serotype 2 and interserotypic reassortants such as strains CA-K785 and 100056 (Jackwood *et al.*, 2011, Soubies *et al.*, 2016). Although it might be speculated that these Algerian isolates are interserotypic reassortants, additional information such as a sequence from an Algerian or at least African serotype 2 IBDV segment B would be needed to further support this hypothesis. Pathogenicity assessment of two representative reassortant isolates, namely isolates 150124 and 150144, revealed virulence comparable to that of the reference vvIBDV 89163 in terms of mortality, clinical signs and bursal atrophy. Although many occurrences of reassortment have been described for IBDV, this phenomenon generally results in viruses displaying a reduced pathogenicity (Jackwood *et al.*, 2011; Le Nouën *et al.*, 2006; Soubies *et al.*, 2016; Wei *et al.*, 2008) compared to vvIBDV. Three notable exceptions are reassortant Chinese called strain ZJ2000 with segment A and segment B related to attenuated and vvIBDV strains, respectively (Wei *et al.*, 2006), the recent Chinese reassortant vvIBDV (Li *et al.*, 2015), whose segment B has an unidentified origin, and one recently identified U.S. interserotypic reassortant strain named K669, (Jackwood *et al.*, 2016). Viruses such as strains 150124 and 150144 described in this study thus represent a rare example of reassortment that preserves pathogenicity. Sequence comparison of VP1 showed that isolates 150124 and 150144 only differ by 4 and 6 amino acids, respectively, from VP1 of serotype 2 strain 23/82. Among these differences, T12S, T123A and L698P are found in both isolates as well as in numerous

Travaux personnels

serotype 1 strains. Although no information is available yet on their role, it will be of interest to address their relative contribution to pathogenicity using reverse genetics.

This study also illustrates the interest of comparative phylogenetic analysis of both genomic segments for IBDV (Le Nouën *et al.*, 2006) to evaluate IBDV genetic diversity, as an analysis restricted to VP2/segment A only would have failed to identify any of the atypical isolates presented in this study. The reference vvIBDV strain 89163 induced different mortality rates in our experiments (Table 8), although animals were inoculated with the same dose of the same viral stock. This variation in mortality rates has been sometimes observed in our experimental settings in previous series of experiments and it is currently investigated whether it might be due to genetic heterogeneity in our SPF chicken flock or to minor differences in husbandry conditions (clogging of floor by contaminated material) in successive series of experiments, that might result in variations either in resistance to lethality or in transmission efficiency following infection, respectively.

Antigenic characterization through VP2 amino acid sequence analysis and AC-ELISA did not reveal any major antigenic variation of the analyzed strains compared with their respective reference sequences. One mild difference, due to a G254S mutation and resulting in lack of mAb 5 binding, was observed for strains 150128 and 150133, similarly to previously analyzed vvIBDV-related strains (Martin *et al.*, 2007, Etteradossi *et al.*, 2004). These results are in agreement with previous works (Etteradossi *et al.*, 1999; Öppling *et al.*, 1991) that did not demonstrate any antigenic variation between European and African IBDV isolates. The relative genetic and antigenic homogeneity of Algerian strains related to European strains suggests that vaccines that have proved efficient to control vvIBDV worldwide should also be able to control infections caused by the Algerian IBDV strains characterized in the present study, provided these vaccines are included in carefully implemented vaccine programs in combination with good biosecurity measures.

In conclusion, this study reveals a broad genetic and phenotypic diversity of IBDV in Algeria due to continuous evolution. We present, to our knowledge, the first description of reassortant IBDV in North Africa. Such reassortant viruses were not detected during the limited study performed in 2000, which suggests that reassortment might have occurred between 2000 and 2014. Because of the relatively high frequency of their detection in this study and their high pathogenicity, special attention should be paid to these reassortant viruses to monitor their diffusion within and beyond Algeria, as such a monitoring would provide additional indications on how these viruses are practically controlled in the field.

Travaux personnels

5. Acknowledgements

This study was supported by grants from i) Algerian Ministry of Higher Education and Research (PNE Funding) and ii) Department des Côtes d'Armor (France).

6. References

- Allamigeon, M-F., and Comte, S., Identification de virus hypervirulents de la maladie de Gumboro au Maghreb., 2001. *Afrique Agri.* N°292.
- Alloui N., Sellaoui S., Proceeding des Onziemes journées de la recherche avicole et palmipèdes à Foie Gras., les 25 et 26 mars 2015. Tours.
- Aly, M.M., Witter, R.L., Fadly, A.M., 1996. Enhancement of reticuloendotheliosis virus-induced bursal lymphomas by serotype 2 Marek's disease virus. *Avian Path.* 25, 81-94
- Bougiouklis, P.A., Sofia, M., Brellou, G., Georgopoulou, I., Billinis, C. and Vlemmas, I., 2007. A clinical case of chicken infectious anemia disease and virus DNA detection in naturally infected broilers in Greece. *Avian Dis.* 51, 639–642.
- Birghan, C., Mundt, E., Gorbalenya, AE., 2000. A non-canonical lon proteinase lacking the ATPase domain employs the ser-Lys catalytic dyad to exercise broad control over the life cycle of a double-stranded RNA virus. *Embo. J.* 19, 114–123.
- Bygrave, A.C., Faragher, J.T., 1970. Mortality associated with Gumboro disease. *Vet. Rec.* 86, 758–759.
- Cui, P., Ma, S.J., Zhang, Y.G., Li, X.S., Gao, X.Y., Cui, B.A. & Chen, H.-Y. 2013. Genomic sequence analysis of a new reassortant infectious bursal disease virus from commercial broiler flocks in Central China. *Arch. Vir.* 158, 1973–1978.
- Da Costa, B., Chevalier, C., Henry, C., Huet, JC., Petit, S., Lepault, J., Boot, H., Delmas, B., 2002. The capsid of infectious bursal disease virus contains several small peptides arising from the maturation process of pVP2. *J. Virol.* 76, 2393–2402.
- Delmas B, Kibenge FSB, Leong JC, Mundt E, Vakharia VN, & Wu, J. L., 2004. Birnaviridae. In *Virus Taxonomy Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, CM. Fauquet, MA. Mayo, J, Maniloff, eds. U Desselberger & LA Ball London. Academic Press, 561–569.
- Dobos, P., B.J. Hill, R. Hallett, D.T. Kells, H. Becht, and D. Teninges . 1979 . Biophysical and biochemical characterization of five animal viruses with bisegmented double-stranded RNA genomes . *J Virol* . 32 : 593 – 605 .
- Escaffre, O., Le Nouën, C., Amelot, M., Ambroggio, X., Ogden, K.M., Guionie, O., Toquin, D., Müller, H., Islam, M.R., Etteradossi, N., 2013. Both genome segments

Travaux personnels

- contribute to the pathogenicity of very virulent infectious bursal disease virus. *J. Virol.* 87, 2767–2780.
- Eterradossi, N., Picault, J.P., Drouin, P., Guittet, M., L'Hospitalier, R., Bennejean, G., 1992. Pathogenicity and preliminary antigenic characterisation of six infectious bursal disease virus strains isolated in France from acute outbreaks. *J. Vet. Med.* B39, 683–691.
- Eterradossi, N., Toquin, D., Rivallan, G., Guittet, M., 1997. Modified activity of a VP2-located neutralizing epitope on various vaccine, pathogenic and hypervirulent strains of infectious bursal disease virus. *Arch. Virol.* 142, 255–270.
- Eterradossi, N., Arnauld, C., Tekaia, F., Toquin, D., Le Coq, H., Rivallan, G., Guittet, M., Domenech, J., van den Berg, T. P. & Skinner, M.A. 1999. Antigenic and genetic relationships between European very virulent infectious bursal disease viruses and an early West African isolate. *Avian Path.* 28, 36–46
- Eterradossi, N., Gauthier, C., Reda, I., Comte, S., Rivallan, G., Toquin, D., de Boissésou, C., Lamandé, J., Jestin, V., Morin, Y., Cazaban, C., Borne, P.M., 2004. Extensive antigenic changes in an atypical isolate of very virulent infectious bursal disease virus and experimental clinical control of this virus with an antigenically classical live vaccine. *Avian Path.* 33, 423–431.
- Eterradossi, N. & Saif, Y.M. 2013. Infectious bursal disease. In D.E. Swayne, J.R. Glisson, L.R. McDougald, L.K. Nolan, D.L. Suarez & V.L. Nair (Eds.). *Diseases of Poultry* 13th edn (pp. 219–246). Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell.
- Gao, H.L., Wang, X.M., Gao, Y.L. & Fu, C.Y. 2007. Direct evidence of reassortment and mutant spectrum analysis of a very virulent infectious bursal disease virus. *Avian Dis.* 51, 893–899.
- Gao, L., Li, K., Qi, X., Gao, H., Gao, Y., Qin, L., Wang, Y., Shen, N., Kong, X., Wang, X., 2014. Triplet amino acids located at positions 145/146/147 of the RNA polymerase of very virulent infectious bursal disease virus contribute to viral virulence. *J Gen Virol.* 95:888–897
- Garriga, D., Navarro, A., Querol-Audi, J., Abaitua, F., Rodriguez, J.F., Verdaguer, N., 2007. Activation mechanism of a noncanonical RNA dependent RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 20540–20545.
- Grimes, T.M., and King, D.J. 1977. Effect of maternal antibody on experimental infections of chickens with type 8 avian adenovirus. *Avian Dis.* 21, 97-112.

Travaux personnels

- Hon, CC., Lam, TY., Drummond, A., Rambaut, A., Lee, YF., Yip, CW., Zeng, F., Lam, PY., Ng, PT., Leung, FC., 2006. Phylogenetic analysis reveals a correlation between the expansion of very virulent infectious bursal disease virus and reassortment of its genome segment B. *J. Virol.* 80, 8503–8509.
- Ismail, N., and Y.M. Saif . 1990 . Differentiation between antibodies to serotypes 1 and 2 infectious bursal disease viruses in chicken sera. *Avian Dis*, 34 : 1002 – 1004 .
- Jackwood, D.J., Y.M. Saif, and P.D. Moorhead . 1985 . Immunogenicity and antigenicity of infectious bursal disease virus serotypes I and II in chickens . *Avian Dis*, 29 : 1184 – 1194
- Jackwood, DJ., Sommer-Wagner, SE., Crossley, BM., Stoute, ST., Woolcock, PR., Charlton, BR., 2011. Identification and pathogenicity of a natural reassortant between a very virulent serotype 1 infectious bursal disease virus (IBDV) and a serotype 2 IBDV. *Virology*. 420, 98 –105.
- Jackwood, D.J., Stoute, S.T., and Crossley, B.M., 2016. Pathogenicity of Genome Reassortant Infectious Bursal Disease Viruses in Chickens and Turkeys. *Avian Dis*. 60, (4), 765-772
- Jakowski, R.M., Fredrickson, T.N., Luginbuhl, R.E and Helmboldt, C.F. 1969. Early changes in bursa of Fabricius from Marek's disease. *Avian Dis*. 13, 215_222.
- [Jeon, WJ.](#), [Lee, EK.](#), [Joh, SJ.](#), [Kwon, JH.](#), [Yang, CB.](#), [Yoon, YS.](#), [Choi, KS.](#), 2008. Very virulent infectious bursal disease virus isolated from wild birds in Korea: epidemiological implications. [Virus Res](#). Oct; 137 (1):153-6. doi: 10.1016/j.virusres.2008.06.013. Epub 2008 Aug 8.
- Kasanga, C.J., Yamaguchi, T., Munangandu, H.M., Ohya, K., Fukushi, H., 2013. Molecular epidemiology of infectious bursal disease virus in Zambia. *J. South Afr. Vet. Assoc.* 84(1):1-4.
- Lee, H-J., Jang, I., Shin, S-H., Lee, H-S., Choi, K-S., 2017. Genome sequence of a novel reassortant and very virulent strain of infectious bursal disease virus. *Genome Announc* 5: e00730-17. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00730-17>.
- Le Nouën, C., Rivallan, G., Toquin, D., Darlu, P., Morin, Y., Beven, V., de Boisseson, C., Cazaban, C., Comte, S., Gardin, Y., Eterradossi, N., 2006. Very virulent infectious bursal disease virus: reduced pathogenicity in a rare natural segment-B reassorted isolate. *J. Gen. Virol.* 87, 209–216.
- Le Nouën, C., Toquin, D., Müller, H., Raue, R., Kean, KM., Langlois, P., Cherbonnel, M.,

Travaux personnels

- Etteradossi, N., 2012. Different domains of the RNA polymerase of infectious bursal disease virus contribute to virulence. *PLoS One* 7,e28064. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028064>.
- Letzel, T., Coulibaly, F., Rey, F.A., Delmas, B., Jagt, E., van Loon, A.A., Mundt, E., 2007. Molecular and structural bases for the antigenicity of VP2 of infectious bursal disease virus. *J. Virol.* 81, 12827–12835.
- Li, Z., Wang, Y., Xue, Y., Li, X., Cao, H., Zheng, S.J., 2012. Critical role for voltage-dependent anion channel 2 in infectious bursal disease virus-induced apoptosis in host cells via interaction with VP5. *J. Virol.*, 86, pp. 1328-1338
- Li, K., Courtilon, C., Guionie, O., Allee, C., Amelot, M., Qi, X., Gao, Y., Wang, X. & Etteradossi, N. 2015. Genetic, antigenic and pathogenic characterization of four infectious bursal disease virus isolates from China suggests continued evolution of very virulent viruses. *Infect. Genet. Evol.* 30, 120–127.
- Lu, Z., Zhang, L., Wang, N., Chen, Y., Gao, L., Wang, Y., Gao, H., Gao, Y., Li, K., Qi, X. & Wang, X. 2015. Naturally occurring reassortant infectious bursal disease virus in northern China. *Virus Res*, 203, 92-95.
- Luque, D., Saugar, I., Rejas, M. T., Carrascosa, J. L., Rodriguez. J. F., Caston, J. R., 2009 Infectious Bursal Disease Virus: Ribonucleoprotein Complexes of a Double-Stranded RNA Virus. *J Mol Biol.* 386, 891-901
- Macreadie, IG., Azad, AA., 1993. Expression and RNA dependent RNA polymerase activity of birnavirus VP1 protein in bacteria and yeast. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 30, 1169 – 1178.
- Martin, A.M., Fallacara, F., Barbieri, I., Tosi, G., Rivallan, G., Etteradossi, N. & Cordioli, P. 2007. Genetic and antigenic characterization of infectious bursal disease viruses isolated in Italy during the period 2002–2005. *Avian Dis.* 51, 863–872.
- McFerran, J.B., M.S. McNulty, E.R. McKillop, T.J. Conner, R.M. McCracken, D.S. Collins, and G.M. Allan . 1980. Isolation and serological studies with infectious bursal disease viruses from fowl, turkey and duck: Demonstration of a second serotype . *Avian Path.* 9 : 395 – 404.
- Méndez, F., de Garay, T., Rodríguez, D., Rodríguez, JF. 2015. Infectious Bursal Disease Virus VP5 Polypeptide: A Phosphoinositide-Binding Protein Required for Efficient Cell-to-Cell Virus Dissemination. *PLoS ONE* 10(4): e0123470. [doi:10.1371/journal.pone.0123470](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123470)

Travaux personnels

- Méndez, F., Romero, N., Cubas, LL., Delgui, LR., Rodríguez, D., Rodríguez, JF. 2017. Non-Lytic Egression of Infectious Bursal Disease Virus (IBDV) Particles from Infected Cells. PLoS ONE 12(1): e0170080. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170080>
- Müller, H., Scholtissek, C. & Becht, H. 1979. The genome of infectious bursal disease virus consists of two segments of double-stranded RNA. J. Virol., 31, 584–589.
- Müller, H., Mundt, E., Etteradossi, N., Islam, MR., 2012. Current status of vaccines against infectious bursal disease. Avian Path. 41, 133–139.
- Nakamura, K., Imada, Y., Maeda, M., 1986. Lymphocytic depletion of bursa of Fabricius and thymus in chickens inoculated with *Escherichia coli*. Vet. Pathol. 23, 712–717.
- Nwagbo, IO., Shittu, I., Nwosuh, CI., Ezeifeka, GO., Odibo, FJ., Michel, LO., Jackwood, DJ., 2016. Molecular characterization of field infectious bursal disease virus isolates from Nigeria. Vet World. 9, 1420–1428.
- [Ogawa, M.](#), [Wakuda, T.](#), [Yamaguchi, T.](#), [Murata, K.](#), [Setiyono, A.](#), [Fukushi, H.](#), [Hirai, K.](#), 1998. Seroprevalence of infectious bursal disease virus in free-living wild birds in Japan. [J Vet Med Sci](#). Nov;60 (11):1277-9.
- Öppling, V., H. Mtoller, and H. Becht, 1991. Heterogeneity of the antigenic site responsible for the induction of neutralizing antibodies in infectious bursal disease virus. *Arch Virol*. 119: 211-223.
- Owoade, A.A., M.N. Mulders, J. Kohnen, W. Ammerlaan, and C.P. Müller . 2004. High sequence diversity in infectious bursal disease virus serotype 1 in poultry and turkey suggests West-African origin of very virulent strains . *Arch. Virol*. 149: 653– 672.
- Payne, L.N. 1998. Retrovirus-induced disease in poultry. *Poult.Sci*. 77: 1204-1212.
- Perterson, R.D., Purchase, H.G., Bumester, B.R., Cooper, M.D., and Good, R.A. 1966. Relationships among visceral lymphomatosis, bursa of Fabricius, and bursa-dependant lymphoid tissue of the chicken. *J.Natl. Cancer Inst*. 36, 585-598.
- Reed, LJ., Muench, H., 1938. A simple method of estimation of fifty per cent endpoints. *Am. J. Higiene*. 27, 493–497.
- Soubies, S.M., Courtillon, C., Briand, F-X., Queguiner-Leroux, M., Courtois, D., Amelot, M., Grousson, K., Morillon, P., Herin, J-B., & Etteradossi, N., 2016. Identification of a European interserotypic reassortant strain of infectious bursal disease virus, *Avian Path*, 46 (1), 19-27
- Soubies, S.M., Courtillon, C., Abed, M., Amelot, M., Keita, A., Broadbent, A., Härtle, S., Kaspers, B., Etteradossi, N., 2017. Propagation and Titration of Infectious Bursal

Travaux personnels

- Disease Virus, Including Non-Cell-Culture-Adapted Strains, Using Ex Vivo Stimulated Chicken Bursal Cells. *Avian Path*, 1-28, October 2017.
- Terao, K., Kera, K and Azina, T. Y., 1978. The effects of trichothecene toxins on the bursa of Fabricius in day-old chicks. *Virchows Arch. B Cell Pathol.* 27, 359-370.
- [Wang, Y.](#), [Qi, X.](#), [Kang, Z.](#), [Yu, F.](#), [Qin, L.](#), [Gao, H.](#), [Gao, Y.](#), [Wang, X.](#). 2010, A single amino acid in the C-terminus of VP3 protein influences the replication of attenuated infectious bursal disease virus in vitro and in vivo. *Antiviral. Res.* 87 (2):223-9.
- Wei, Y., Li, J., Zheng, J., Xu, H., Li, L. & Yu, L. 2006. Genetic reassortment of infectious bursal disease virus in nature. *Biochem Biophys Res Commun*, 350, 277–287.
- Wei, Y., Yu, X., Zheng, J., Chu, W., Xu, H., Yu, L., 2008. Reassortant infectious bursal disease virus isolated in China. *Virus Res.* 131, 279 –282.
- Xia, R.X., Wang, H.Y., Huang, G.M., Zhang, F., 2008, Sequence and phylogenetic analysis of a Chinese very virulent infectious bursal disease virus. *Arch Virol.* 153, 1725-1729.
- Yu F, Ren X, Wang Y, Qi X, Song J, Gao Y, Qin L, Gao H, Wang X., 2013, A single amino acid V4I substitution in VP1 attenuates virulence of very virulent infectious bursal disease virus (vvIBDV) in SPF chickens and increases replication in CEF cells. *Virology.* Jun 5; 440 (2):204-9. doi: 10.1016/j.virol.2013.02.026. Epub 2013 Mar 26.

Travaux personnels

7. Supplementary tables and figures

Supplementary table 1: Background clinical information, PCR results and GenBank accession number of the studied recent Algerian isolates (from 2014 and 2015)

Isolate designation	Geographic origin	Age (days)	Number of chickens/Flock	Mortality (number)	Gross lesions in bursa	Vaccination	GenBank Accession number of partial segment (Complete segment)	
							VP2	VP1
150124	TABLATE/MEDEA	30	3600	100	Congested	Cevac IBDL	KY555572 (MF969105)	KY555573 (MF969106)
150142	BERROUAGHIA	31	4000	10	Hemorrhagic and edematous	Cevac IBDL	KY555594	KY555595
150123	ALGIERS	33	4700	40	Hemorrhagic	No information	KY555570	KY555571
150143	ALGIERS	27	2000	40	Hypertrophic and hemorrhagic	Cevac IBDL	KY555596	KY555597
150131	MEDEA	31	1400	30	Hemorrhagic and edematous	NOBILIS 228E	MF969120	MF969124
150139	TABLATE	30	3500	55	Moderately atrophied and congested	NOBILIS 228E	KY555592	KY555593
150140	ALGIERS	32	5000	40	Hemorrhagic and edematous	Cevac IBDL	MF969121	MF969121
150132	OMARIA/ MEDEA	33	1300	60	Hemorrhagic and edematous	No information	KY555584	KY555585
150134	ALGIERS	52	2800	40	Atrophied and congested	Cevac IBDL	KY555588	KY555589
150129	MEDEA	37	1500	40	Hemorrhagic and edematous	Cevac IBDL	KY555580	KY555581
150130	TABLATE	28	1400	30	Hemorrhagic and edematous	NOBILIS 228E	KY555582	KY555583
150144	BENI SLIMANE	30	2500	25	Atrophied and congested	Cevac IBDL	KY555598 (MF969115)	KY555599 (MF969116)
150126	BENI SLIMANE	38	2500	200	Congested	Not vaccinated	KY555574	KY555575
150136	MEDEA	29	1600	12	Hemorrhagic	Cevac IBDL	KY555590 (MF969113)	KY555591 (MF969114)
150133	CHLEF	27	2000	20	Hemorrhagic	No information	KY555586 (MF969111)	KY555587 (MF969112)
150127	TIZI-OUZOU	36	5500	40	Hypertrophic with petechiae	Cevac IBDL	KY555576 (MF969107)	KY555577 (MF969108)
150128	TIZI-OUZOU	31	3500	25	Congested	Cevac IBDL	KY555578 (MF969109)	KY555579 (MF969110)
150152	TIZI-OUZOU	30	3000	21	Hemorrhagic	Cevac IBDL	MF969118	MF969123
150150	AIN DEFLA	28	3000	15	Congested	Not vaccinated	MF969117	MF969122

Travaux personnels

Supplementary table 2: Background information, PCR results and GenBank accession numbers of the Algerian isolates collected in 2000

Isolate designation	Geographic origin	GenBank accession number (partial segment)	
		VP2	VP1
00099.1	Bejaia	MF479707	MF479700
00099.4	Meftah-Blida	MF479708	MF479701
00411.E1	Jijel	MF479709	MF479702
00411.E3	Gueltazegua-Sétif	MF479710	MF479703
00411.E4	Hamam Sokhna-Sétif	MF479711	MF479704
00411.E5	Al Eulma-Sétif	MF479712	MF479705
01272	Khemis Meliana	MF479713	MF479706

Travaux personnels

Supplementary table 3: List of GenBank accession numbers of viral strains sequences used in phylogenetic analyses

Strain	VP2	VP1
002/73	AF148073.1	AJ878682.1
7741	JQ403647.1	JQ403646.1
GX/_China	AY444873.3	AY705393.2
02015.1	AJ878909.1	AJ880090.2
HLJ0504_//China_2005_120009	GQ451330	GQ451331
HeB10XS04_/_China_2010_130011	KF569801	KF569802
HuN11-01_/_China_2011_130013	LM651367	LM651368
UK661_/_United_Kingdom_1994	X92760	AJ318897
HK46_/_Hong_Kong_1994	AY321957.1	AJ878668.1
89163_/_France_1989	Y14956.1	AJ878661.1
94432_/_France_1984	Y14955.1	AJ878678.1
99323_/_Egypt	AJ583500.1	AJ878680.1
D69/48	AF240686.1	AF240687.1
SH99_/_China_1999_130012	LM651365	/LM651366
K669	JN411133.1	JN411134.1
CA-D495	JF907703	JF907704
CA-K785	JF907702	JF907705
IBDV_strain_50ALG	KP729482.1	not available
IBDV_strain_09ALG	KP729479.1	not available
IBDV_strain_20ALG	KP729480.1	not available
IBDV_strain_03ALG	KP729478.1	not available
IBDV_strain_38ALG	KP729481.1	not available
88180/_Ivory-Coast	AJ001941.1	AJ878638.1
VarA_/_USA_1985	AF293792.1	AJ878675.1
D6337	KU867914.1	KU867910.1
VarE/_USA_1985	AF293788.1	AJ878676.1
Var_GLS_5_/_USA_1987	AJ878906.1	AJ878677.1
Bursine	AJ878894	AJ87865
Cu1WT_/_Germany	AJ878886.1	AJ878644.1
F52/70	HG974565.1	AJ878643.1
CEVAC_IBDL	AY332562.1	AJ878660.1
228E	AJ878892	AJ8786
Tadforte	AJ878893.1	AJ87865
CEF94	AF194428.1	AF194429.1
CT/France	Y14961	AJ878653
Cu1M	AF362775.1	AF362771.1
TY89	AJ878912	AJ878683
23/82	AJ878913	AJ878684
Turkey/PA/00924/14	KP642112.1	KP642111.1
D2712	KU867911.1	KU867912.1
T3599	KU867909.1	KU867913.1

Travaux personnels

OH	HQ224883.1	/
UYO190/NG/2014	KP152247.1	KP172096.1
PLATEAU161/NG/2014	KP152315.1	KP172141.1
PLATEAU7/NG/2009	KP152305.1	KP266339.1
PLATEAU157/NG/2014	KP152311.1	KP172138.1
PLATEAU19/NG/2009	KP266322.1	KP266335.1
399 ALGERIA	MF142528.1	MF142469.1
80GA	AJ508752	AJ878652
78Gsz	AJ508761	AJ878651

Travaux personnels

Supplementary figures

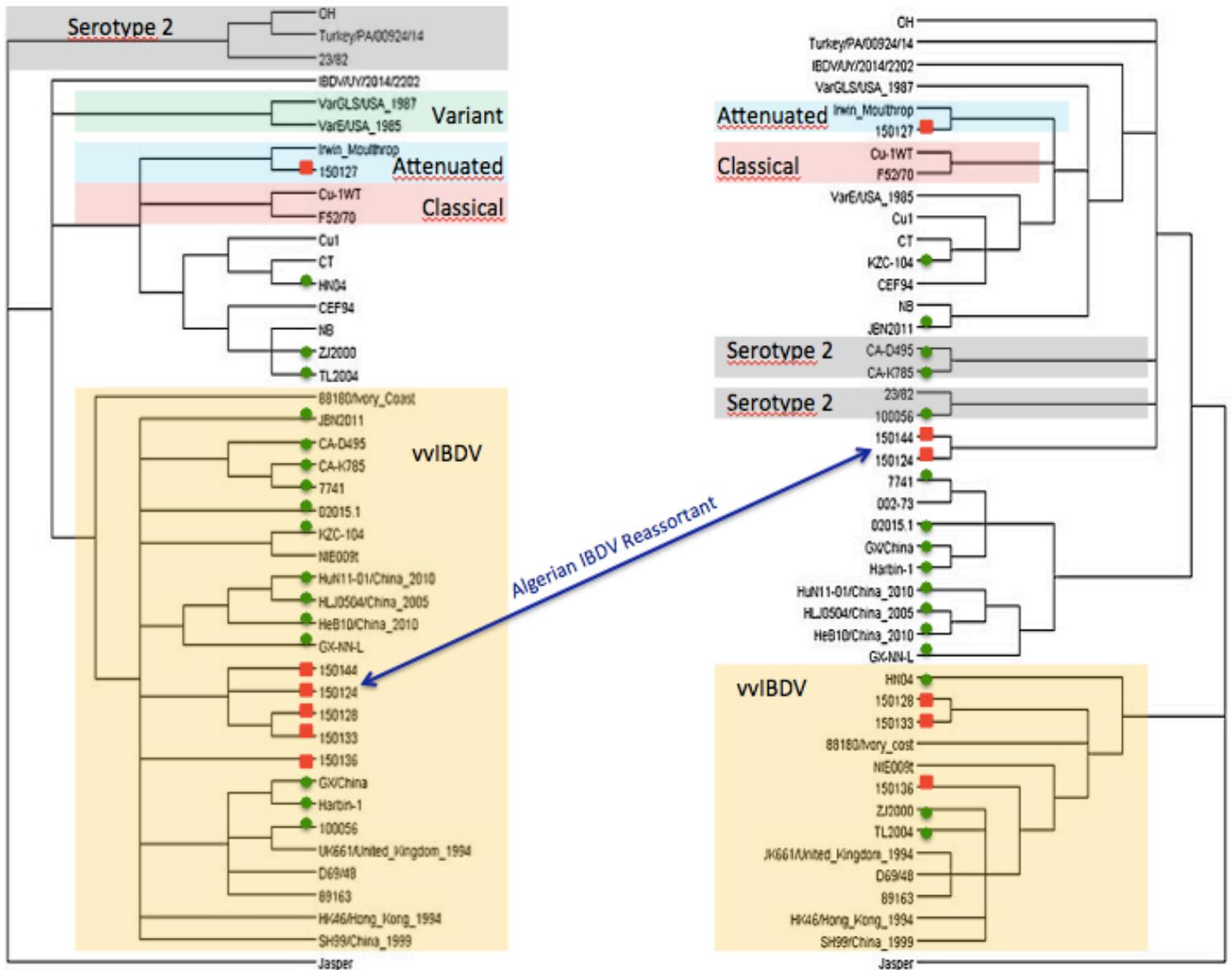
Supplementary figure 1: Amino acid differences in VP2 partial sequences between reference strains and the studied Algerian strains.

	200	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300	310	320	330	340	
89163	LDPKMTATCD	SSDRPRVYTI	TAADDYQFSS	QYQAGGVTIIT	LFSANIDAIT	SLSIGGELVF	QTSVQGLILG	ATIYLIGFDG	TAVITRAVAA	DNGLTAGTDN	LMPFNIVIPT	SEITQPITSI	KLEIVTSKSG	GQAGDQMSWS	ASGSLAVTIH	GGNYPGALI
150123
150124
150126
150129
150130
150131
150132
150134
150139
150140
150142
150143
150144
150144
150136
150133S.....
150128S.....
CEVAC_IBDLL.....P.....V.....V.....T.....N.....
150127L.....P.....V.....V.....T.....N.....
150152L.....P.....V.....V.....T.....N.....
150150L.....P.....V.....V.....T.....N.....

Supplementary figure 2: Amino acid differences in VP2 partial sequences between reference strains and the studied Algerian strains.

	80	90	100	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200	210	
89163	PENEYETD	QILPDLAWMR	QIEGAVLKPT	LSLPIGDQEQY	FPKYYPHTHRP	SKEKPNAYPP	DIALLKQMIY	LFLQVPEATD	NLKDDEVTLT	QNIRDKAYGS	GTVMGQATRL	VAMKEVATGR	NPNKDPLKLG	YTFESIAQLL	DITID
150128
150133S.....
150130V.....
150123N.....
150132
150126
150129
150136
150143
150131
CEVAC_IBDLNE D.....
150150NE D.....
150152NE D.....
150127NE D.....
23/82	AQ.....T.....NE G.....
150139NE G.....
150124NE G.....
150134NE G.....
150142NE G.....
150140NE GP.....
150144NE G.....
CT/France	AQ.....NE G.....
F52/70A.....F.....NE G.....E.....
Var_GLS	AQ.....NE GP.....

Travaux personnels



Supplementary figure 3: Condensed consensus phylogenetic trees deduced from the full-length genome segment A (left) and segment B (right) of 41 IBDV strains using the neighbor-joining method. The trees are based on 1000 bootstrap replicates. Only branches supported by a bootstrap value >75% (values mentioned) are displayed. Potential reassortant IBDV strains are represented by green circle. Algerian IBDV strains are marked by red squares. GenBank accession numbers are listed in supplementary Tables 1 and 3.

DISCUSSION GENERALE

Les travaux de recherche entrepris dans cette thèse ont contribué d'une part à connaître le profil génétique des souches virales IBDV circulantes lors d'épisodes de suspicion clinique d'IBD dans les élevages avicoles Algériens entre 2014 et 2015 et d'observer l'évolution génétique de ces souches virales depuis 2000. D'autre part, ces travaux ont permis de comparer l'antigénicité et le pouvoir pathogène de ces souches Algériennes à celle des souches IBDV de référence.

1. Collecte et analyses des échantillons

Au total 190 bourses de Fabricius ont été prélevées lors de 35 épisodes de suspicion clinique de la maladie. La bourse de Fabricius est l'organe cible du virus et donc le prélèvement de choix pour la recherche de l'IBDV.

Les prélèvements proviennent de quelques régions du Nord-Centre d'Algérie (Alger, Blida, Tizi Ouzou, Bouira, Médéa, Chlef et Aïn Defla) connues pour leur forte densité avicole.

La zone géographique n'a pas été un choix délibéré mais a été dicté par la zone d'activité des vétérinaires praticiens qui ont accepté de coopérer dans la collecte des BdF.

Des résultats de RT-PCR positifs ont été obtenus chez 22 des 35 échantillons. Les quantités de produit d'amplification obtenues dans ces 22 échantillons ont été suffisantes pour permettre le séquençage partiel des segments A et B ou le séquençage d'au moins un segment (deux souches avec séquences partielles du segment A et une souche avec uniquement le séquençage du segment B).

L'absence de virus dans les 13 échantillons négatifs peut être expliquée soit par un échantillonnage tardif des bourses atrophiques après élimination du virus, soit parce que la charge virale ou la sensibilité de la RT-PCR étaient trop faibles pour permettre la détection virale, soit parce que le diagnostic de la maladie était basé uniquement sur des aspects cliniques (principalement les lésions de la BdF) et ces aspects, en particulier une atrophie, pourraient être dues à d'autres facteurs non-IBDV tels que les mycotoxines, *Escherichia. coli*, le virus de l'anémie infectieuse du poulet, le virus de la Marek, l'adénovirus aviaire, la leucose lymphoïde aviaire ou le virus de la réticuloendothéliose.

L'absence d'amplification d'un seul segment dans trois échantillons peut être expliquée par une faible charge virale dans les BdF, mais des mutations empêchant l'hybridation des amorces RT-PCR ne peuvent être exclues.

Discussion générale

2. Diversité génétique et phénotypique des souches IBDV circulantes en Algérie

L'identification des relations génétiques entre les différentes souches d'IBDV apporte des informations importantes sur la dissémination géographique des virus et sur les éventuels phénomènes de recombinaisons et de réassortiments susceptibles de se produire chez les virus segmentés et de modifier ou non leur pathogénicité.

Le séquençage complet des deux segments d'IBDV est difficilement applicable en routine. Pour cela, le laboratoire VIPAC de l'ANSES Ploufragan a contribué dans la mise en place d'une méthode (RT-PCR et séquençage partiels) permettant d'étudier les relations génétiques ainsi que l'évolution de ce virus en se basant sur de courtes régions au niveau des deux segments A et B de l'IBDV (Le Nouën *et al*, 2005).

Dans un premier temps nous avons voulu connaître le profil génétique des souches IBDV isolées en se basant sur la phylogénie des séquences partielles du segment A (VP2) et du segment B (VP1) en utilisant la méthode décrite ci-dessus. Par la suite, nous avons effectué un séquençage complet des deux segments pour les souches les plus intéressantes sur le plan génétique ou phénotypique à l'aide de la méthode NGS « Next Generation Sequencing ».

L'étude phylogénétique des segments partiels a été donc basé sur les 19 échantillons possédant une séquence partielle pour le segment A et le segment B. L'évolution génétique des souches IBDV Algériennes a été étudiée par la comparaison des souches récemment isolées (2014-2015) avec les souches caractérisées par le laboratoire VIPAC dans le cadre d'un projet OIE en 1999.

Les résultats de cette étape révèlent une grande diversité génétique des souches d'IBDV en Algérie, à savoir, i) la circulation continue des virus apparentés aux vvIBDV européens et asiatiques depuis au moins 1999, ii) la circulation actuelle de virus encore étroitement apparentés mais néanmoins différents des vvIBDV européens, iii) la détection de virus réassortants avec un segment A apparenté aux vvIBDV européens et asiatiques et un segment B d'origine inconnue.

2.1. Détection de souches vaccinales d'IBDV

Trois souches caractérisées présentent un profil génétique apparenté à la souche vaccinale IBDL pour les deux segments. Ce résultat n'a pas été inattendu puisque ce type de vaccin est largement utilisé sur le terrain. C'est un vaccin intermédiaire plus qui peut induire des lésions

DISCUSSION GENEARALE

au niveau de la BdF sans qu'il y ait de la mortalité et ces lésions peuvent être confondues avec des lésions provoquées par un virus sauvage de l'IBD. Une de ces trois souches vaccinales, la 150127 qui en effet présentait un profil pathogène compatible avec une souche vaccinale intermédiaire plus (faible morbidité, absence de mortalité, atrophie de la bourse nette).

2.2. Circulation continue des souches vvIBDV en Algérie depuis au moins 1999

Selon notre étude, 8/19 des souches séquencées sont apparentées aux vvIBDV européens et asiatiques pour le segment A et le segment B. Des souches apparentées génétiquement aux vvIBDV ont aussi été isolées en Algérie en 2000 lors de l'enquête menée par l'OIE. Ces virus hypervirulents continuent de circuler dans nos élevages, ce qui est en concordance avec les observations de formes aiguës de l'IBD par certains vétérinaires sur le terrain.

On pense que les souches vvIBDV se sont propagées depuis l'Afrique de l'Ouest au milieu des années 80 (Etteradossi *et al.*, 1999, Hon *et al.*, 2006, Owoade *et al.*, 2004). La propagation vers l'Algérie serait produite à travers les oiseaux migrateurs sauvages (Ogawa *et al.*, 1998, Jeon *et al.*, 2008) ou par des échanges commerciaux.

Il semblerait donc qu'il y ait une co-évolution des deux segments génomiques. Cette co-évolution des deux segments IBDV est observée pour la majorité des souches IBDV de notre étude. Ce résultat est en concordance avec les résultats de Le Nouën *et al.*, 2006.

Il est intéressant de noter que deux de ces isolats hypervirulents présentaient des degrés variables de pathogénicité, bien que leur génome soit étroitement apparenté au vvIBDV européens et asiatiques: l'isolat 150131 présentait une pathogénicité comparable sur poulets EOPS (mortalité, morbidité et atrophie bursale) à la souche vvIBDV 89163 de référence européenne. En revanche, aucune mortalité n'a été observée avec l'isolat 150136 malgré une morbidité et une atrophie de la bourse comparables à celles induites par les souches de référence.

Des souches vvIBDV présentant un pouvoir pathogène réduit sont décrites dans la littérature scientifique (Le Nouën *et al.*, 2006 ; Escaffre *et al.*, 2013). Le faible pouvoir pathogène de l'isolat 150136 pourrait être dû à la présence de mutations dans l'un des segments génomiques. La comparaison des séquences des deux segments génomiques de 150136 avec une séquence de vvIBDV de référence a fait apparaître plusieurs mutations nucléotidiques et aminopeptidiques dans les deux segments.

Par exemple, la mutation A990V dans sa polyprotéine (segment A) est située dans la région C-terminale de la protéine VP3, dont il a été démontré qu'elle active la polymérase VP1 (Garriga *et al.*, 2007). Une souche d'IBDV recombinante, adaptée aux cultures cellulaires, Gt,

Discussion générale

présentait une altération de la réplication lorsque la mutation V990A était introduite dans la protéine VP3 (Wang *et al.*, 2010). Une mutation inverse (A990V comme vu dans 150136) n'a pas encore été décrite dans la littérature et son impact sur le pouvoir pathogène des vvIBDV n'est pas connu. Trois mutations ont également été observées dans la séquence protéique VP1 de l'isolat 150136: Y243F, T329S et I859T. Enfin, la mutation E120K, unique à la protéine VP5 de 150136 a également été observée. Cette mutation ne se situe pas dans les domaines d'interaction de la VP5, déjà décrits dans la littérature (domaine d'interaction de VP5 avec VDAC2 (Li *et al.*, 2012), et le domaine d'interaction avec les phosphoinositides (Mendéz *et al.*, 2015). Son impact sur la pathogénicité de l'isolat 150136 est difficile à anticiper.

Le système de génétique inverse pourrait constituer un excellent outil pour évaluer l'influence de ces cinq changements dans un virus vvIBDV typique et aider à comprendre leur contribution respective à la faible pathogénicité de l'isolat 150136.

2.3. Circulation actuelle de virus encore étroitement apparentés mais néanmoins différents des vvIBDV européens

Les isolats 150128 et 150133 représentaient un second type de virus identifié dans cette étude et semblaient très similaires aux séquences partielles de la souche «399 Algérie» publiées récemment par (Michel et Jackwood, 2017). L'analyse de séquence complète des isolats 150128 et 150133 a montré que bien que leurs segments A présentaient un seul changement d'acide aminé G254S comparé à la souche 89163 (vvIBDV de référence), déjà décrit dans certains vvIBDV africains et européens (Martin *et al.*, 2007; Nwagbo *et al.*, 2016; Owoade *et al.*, 2004), leur segment B est apparenté mais néanmoins significativement différent de vvIBDV. Un autre segment B similaire «apparenté mais différent» de vvIBDV a déjà été décrit chez des souches ivoiriennes (Eterradossi *et al.*, 1999, Owoade *et al.*, 2004, Le Nouën *et al.*, 2006) et a été suggéré comme représentant des segments B qui circulaient dans l'Afrique peu de temps avant l'émergence des vvIBDV en Europe. A noter que les deux segments A et B de ces souches ivoiriennes sont phylogénétiquement apparentés aux vvIBDV mais néanmoins significativement différents des vvIBDV Européens et Asiatiques. Ces souches ivoiriennes constituent donc une lignée particulière apparentée aux vvIBDV.

Dans le cas des isolats 150128 et 150133, les deux segments IBDV appartiennent à deux lignées génétiques différentes des vvIBDV. Un réassortiment au sein du même groupe génétique des vvIBDV est donc probable.

Ces isolats 150128 et 150133 proviennent de deux régions algériennes séparées par des centaines de kilomètres (Médéa et Tizi Ouzou), ce qui indique que des virus similaires sont

DISCUSSION GENEARALE

présents dans tout le pays. Ces isolats de vvIBDV atypiques n'ont pas été détectés en 2000. Le nombre d'échantillons prélevés à l'époque a dû limiter la détection de ces souches vvIBDV atypiques.

Il est intéressant de noter que la mortalité induite par les isolats 150128 et 150133 chez des poulets EOPS était significativement réduite par rapport à la mortalité induite par la souche 89163 (vvIBDV de référence), la morbidité et l'atrophie bursale ont été similaires à celles de la souche 89163. Cette diminution du pouvoir pathogène, peut être expliquée par des différences dans les premières phases de réplication de ces virus avant 4 jours p.i. ou par des changements dans la réponse immunitaire de l'hôte dans les premiers stades de l'infection. Ainsi, l'étude de la cinétique de réplication de ces virus permettrait peut-être d'expliquer ces différences de pouvoir pathogène.

Par ailleurs, des mutations ont été observées chez les isolats 150128 et 150133 telle que la mutation V4I qui a été suggérée précédemment comme responsable de l'atténuation du pouvoir pathogène de la souche vvIBDV chinoise « HLJ0504 » (Yu *et al.*, 2013). Cette mutation pourrait donc contribuer au phénotype atténué des isolats 150128 et 150133.

2.4. Détection de virus réassortants avec un segment A apparenté aux vvIBDV européens et asiatiques et un segment B d'origine inconnue

Le dernier groupe de virus identifié dans cette étude est représenté par une proportion significative (6 sur 19) des isolats récemment analysés, et qui n'ont pas été détectés dans les isolats de 2000. Tous ces isolats proviennent de la région de Médéa. Leur segment A est étroitement apparenté aux vvIBDV européens et asiatiques alors que leur segment B n'est lié à aucune séquence de référence. Les résultats du séquençage complet des deux segments génomiques a confirmé les résultats du séquençage partiel. Ces virus sont donc potentiellement des réassortants naturels. Bien que l'origine précise de leur segment B ne peut être établi avec certitude, celui-ci se retrouve dans un groupe contenant les segments B des virus classiques, atténués et variants, tout comme les segments B des virus apparentés au sérotype 2 et des réassortants intersérotypiques Américains et Européens tels que les souches CA-K785 et 100056 (Jackwood *et al.*, 2011, Soubies *et al.*, 2016).

Il peut être spéculé que ces réassortants algériens sont des réassortants intersérotypiques : des informations supplémentaires telles qu'une séquence provenant d'un segment IBDV de sérotype 2 Algérien ou Africain seraient néanmoins nécessaires pour appuyer cette hypothèse.

Discussion générale

Chez l'IBDV, plusieurs travaux ont démontré la présence des souches réassortantes naturelles (voir tableau 1 dans la présentation bibliographique). Le taux d'incidence spontanée de ce phénomène chez l'IBDV n'a jamais été étudié et évalué statistiquement, pour cela il faut un nombre important de souches isolées aléatoirement sur une période donnée et dans différentes régions géographiques.

Des IBDV réassortants ont également été régénérés en laboratoire, démontrant la faisabilité du réassortiment (Boot *et al.*, 2000 ; Brandt *et al.*, 2001 ; Liu *et al.*, 2004 ; Zierenberg *et al.*, 2004).

Par ailleurs, les positions nucléotidiques contrôlant la comptabilité des segments génomiques des différentes lignées d'IBDV et donc le fitness et le succès évolutif d'un potentiel virus réassortant n'ont pas encore été identifiées. Les mécanismes susceptibles de contrôler la comptabilité des segments incluent les interactions entre VP3 (codée par le segment A) et VP1 (codée par le segment B) (Lombardo *et al.*, 1999 ; Tacken *et al.*, 2000 ; Tacken *et al.*, 2002, Maraver *et al.*, 2003 ; Chevalier *et al.*, 2004), entre VP1 ou VPg et les segments génomiques (Müller & Nitschke, 1987), ou entre VP1 et VP4 (codée par le segment A) (Birghan *et al.*, 2000).

L'évaluation du pouvoir pathogène de deux de ces isolats réassortants (isolats 150124 et 150144) a révélé une virulence comparable à celle de la souche de référence vvIBDV « 89163 » en termes de mortalité, morbidité ainsi que l'atrophie de la BdF.

Bien que de nombreux cas de réassortiment aient été décrits pour l'IBDV, ce phénomène se traduit généralement par des virus présentant un pouvoir pathogène atténué (Jackwood *et al.*, 2011, Le Nouën *et al.*, 2006, Soubies *et al.*, 2016, Wei *et al.*, 2008) par rapport aux souches vvIBDV. Trois exceptions ont été décrites dans la littérature, la souche réassortante chinoise « ZJ2000 » avec un segment A apparenté aux souches atténuées et un segment B apparenté au vvIBDV (Wei *et al.*, 2006), trois souches réassortantes chinoises (HLJ0504, HeB10 et HuN11) avec un segment A apparenté aux vvIBDV et un segment B d'origine non identifiée (Li *et al.*, 2015), et la souche réassortante intersérotypique « K669 » récemment identifiée aux USA (Jackwood *et al.*, 2016).

Les virus tels que les souches 150124 et 150144 décrits dans cette étude représentent donc un exemple rare de réassortiment qui préserve une pathogénicité élevée.

La comparaison des séquences de VP1 a montré que les isolats 150124 et 150144 diffèrent seulement par 4 et 6 acides aminés, respectivement, de VP1 de la souche 23/82 du sérotype 2. Parmi ces différences, on trouve T12S, T123A et L698P dans les deux isolats ainsi que dans de nombreuses souches de sérotype 1. Bien qu'aucune information ne soit encore disponible

DISCUSSION GENEAREALE

sur leur rôle, le système de génétique inverse pourrait constituer un excellent outil pour évaluer leur influence sur la pathogénicité.

Enfin, cette étude illustre l'intérêt de l'analyse phylogénétique comparative des deux segments génomiques pour IBDV (Le Nouën *et al.*, 2006) pour évaluer la diversité génétique de ce virus, car une analyse restreinte à VP2 / segment A aurait échoué à identifier l'un des atypiques isolats présentés dans cette étude.

3. L'antigénicité des souches IBDV isolées en Algérie

Une technique ELISA de capture antigénique a été mise au point par le laboratoire VIPAC pour permettre d'évaluer rapidement, à partir de broyats de BdF infectés, la réactivité des épitopes neutralisants représentés sur la VP2 du virus infectant. Pour cela, une batterie d'anticorps monoclonaux murins neutralisants la protéine VP2 a été produite et ces anticorps ont la capacité de révéler des différences antigéniques au sein des souches IBDV (Eterradossi *et al.*, 1997).

Dans cette étude, la caractérisation antigénique par l'analyse des alignements aminopeptidiques des séquences VP2 et l'ELISA capture antigénique n'ont révélé aucune variation antigénique majeure des souches analysées par rapport aux séquences de référence respectives. Une seule différence a été notée pour les souches 150128 et 150133, due à une mutation G254S et entraînant une absence de capture du mAb 5. Cette mutation a déjà été rapportée chez des souches apparentées aux vvIBDV précédemment analysées (Martin *et al.*, 2007, Eterradossi *et al.*, 2004). Ces résultats sont en accord avec des travaux antérieurs (Eterradossi *et al.*, 1999, Öppling *et al.*, 1991) qui n'ont démontré aucune variation antigénique entre les isolats européens et les isolats africains d'IBDV.

4. Variabilité des taux de mortalité induits par la souche vvIBDV de référence 89163

La souche de référence vvIBDV 89163 a induit des taux de mortalité différents dans nos expérimentations animales. Bien que les animaux aient été inoculés avec la même dose du même stock viral. Cette variation des taux de mortalité a parfois été observée dans des séries d'expériences précédentes menée par le laboratoire d'accueil et ils sont actuellement en cours d'étude dans des séries successives d'expériences pour voir si cela est dû à l'hétérogénéité

Discussion générale

génétique des troupeaux de poulets EOPS ou à des différences mineures dans les conditions d'élevage qui pourraient entraîner des variations de la résistance à l'infection ou de l'efficacité de la transmission après l'infection.

5. Protection vaccinale contre les souches IBDV en Algérie

L'homogénéité génétique et antigénique relative des souches algériennes liées aux souches européennes suggère que les vaccins utilisés actuellement et qui se sont révélés efficaces pour contrôler les vvIBDV dans le monde devraient également être capables de contrôler les infections provoquées par les souches IBDV algériennes caractérisées dans la présente étude.

Malgré ce résultat, des échecs de vaccination contre l'IBD sont souvent observés sur le terrain. Très récemment, une étude chinoise a démontré, dans les conditions expérimentales, qu'une souche vaccinale intermédiaire plus (GD 10111) utilisée contre l'IBDV ne protégeait que partiellement contre certaines souches réassortantes comportant un segment A apparenté aux vvIBDV et un segment B d'origine inconnue (Chen *et al.*, 2018). De façon similaire, un essai expérimental permettrait de vérifier la protection vaccinale induite vis-à-vis des souches IBDV réassortantes isolées dans notre étude.

Le problème majeur posé depuis plusieurs années pour la vaccination contre l'IBDV est la détermination de la période optimale pour la vaccination des jeunes poussins. Les anticorps d'origine maternelle interviennent pour limiter le pouvoir pathogène naturel des souches virales sauvages mais également le pouvoir pathogène résiduel des souches vaccinales ; leur activité peut parvenir à empêcher la prise vaccinale : des titres neutralisants de 1/500, et variant de 1/250 à moins de 1/100, ont été rapportés comme étant expérimentalement les quantités d'anticorps minimales qui peuvent interférer avec l'infection soit par des virus sauvages très virulents, soit par des virus vaccinaux de virulence décroissante (Lucio & Hitchner, 1979 ; Skeeles *et al.*, 1979 ; Lütticken *et al.*, 1994).

Comme la souche pathogène est capable de franchir des hauts titres en anticorps d'origine maternelle, et que l'immunité passive transmise au poussin n'est pas forcément homogène (Wyeth & Cullen, 1976 ; Goddard *et al.*, 1994), il existe toujours une période critique où des individus sensibles et d'autres protégés coexistent au sein d'un même lot (Van den Berg & Meulemans, 1991). Le principal problème réside donc dans la nécessité de déterminer la bonne date de l'administration du vaccin pour éviter que l'animal vacciné ne possède encore une immunité passive résiduelle suffisante pour neutraliser le virus vaccinal

DISCUSSION GENEARALE

(Muskett et al., 1979 ; Van den Berg & Meulemans, 1991) ; tout en sachant que lorsque les anticorps d'origine maternelle atteignent un seuil non protecteur, les poulets deviennent sensibles à une éventuelle infection. Pour cela, il est important de connaître le statut immunitaire des futures reproductrices avant l'entrée en production, et les anticorps d'origine maternelle doivent être titrés pendant la première semaine de vie chez un lot de poussins qui en est issu (Wyeth & Cullen, 1976). Jusqu'à présent aucun programme de vaccination universel ne peut être proposé. Le programme de vaccination doit être adapté à chaque élevage en fonction des variables rencontrées sur le terrain. D'autres approches sont utilisées pour essayer de résoudre ces difficultés liées à cette période critique comme l'utilisation des vaccins recombinants qui pourraient présenter comme avantage l'absence du pouvoir pathogène résiduel ainsi que l'absence d'interférence avec les anticorps d'origine maternelle et l'administration au plus tôt des vaccins immuns complexes capable de s'implanter dans la BdF dès le premier jour de vie du poussin et malgré l'immunité maternelle résiduelle, avant que les poussins ne deviennent sensibles à l'infection par le virus sauvage.

Aussi, la conduite vaccinale doit respecter certaines conditions comme : la conservation des vaccins, le mode d'administration, la qualité de l'eau utilisée dans la vaccination...

Un autre facteur qui pourrait jouer un rôle dans l'échec des vaccinations contre l'IBDV est le non-respect des mesures de biosécurité dans les élevages de volailles. En Algérie, le recours à l'utilisation des serres avicoles souvent très mal isolées, dont les mesures de biosécurité sont mal maîtrisées et difficilement contrôlables pourrait être un facteur important dans l'émergence des maladies aviaires.

Enfin, une combinaison entre de bonnes conduites vaccinales ainsi que de bonnes mesures de biosécurité seraient des étapes clés dans la réussite de la vaccination contre l'IBD.

CONCLUSION-PERSPECTIVES

CONCLUSION-PERSPECTIVES

Nos travaux révèlent une grande diversité génétique et phénotypique des souches IBDV en Algérie en raison de leur évolution continue. A notre connaissance, nous présentons la première description de la présence des réassortants IBDV en Afrique du Nord. De tels virus n'ont pas été détectés lors de l'étude réalisée en 2000, ce qui suggère qu'un réassortiment entre deux souches IBDV a été produit entre 2000 et 2014. En raison de la fréquence relativement élevée de leur détection dans cette étude et de leur pathogénicité élevée, une attention particulière devrait être accordée à ces réassortants pour mieux surveiller leur diffusion en Algérie et au-delà, car une telle surveillance fournirait des indications supplémentaires sur la manière dont ces virus sont contrôlés en pratique sur le terrain.

Les séquences amino-peptidiques de la région hypervariable des souches IBDV Algériennes isolées dans cette étude 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 et réassortantes qui pourrait contribuer à leur capacité à échapper à l'immunité passive (capacité répliquative à évaluer expérimentalement).

Enfin, les résultats obtenus lors de ces travaux ouvrent d'autres perspectives de recherche sur l'IBDV tels que :

- L'évaluation de l'efficacité des vaccins utilisés sur le terrain contre les souches réassortantes
- L'utilisation d'un système génétique inverse pour l'exploration des bases moléculaires de pathogénicité chez les souches vvIBDV atypiques et les souches réassortantes.
- Une exploration des mécanismes moléculaires permettant le réassortiment de ces souches récemment isolées.
- Une recherche de souches IBDV présents chez le canard et la dinde ou dans l'avifaune sauvage dans le but de retrouver l'origine du segment B des souches réassortantes.

Références bibliographiques

A

Allamigeon, M-F., and Comte, S. (2001) Identification de virus hypervirulents de la maladie de Gumboro au Maghreb. *Afrique Agri*. N°292.

Alloui N., Sellaoui S. (2015). Proceeding des Onziemes journées de la recherche avicole et palmipèdes à Foie Gras., les 25 et 26 mars 2015. Tours.

Allan, W. H., Faragher, J. T. & Cullen, G. A. (1972). Immunosuppression by the infectious bursal agent in chickens immunized against Newcastle disease. *Veterinary Record*, **90** : 511-512.

Almeida, J. D. & Morris, R. (1973). Antigenically-related viruses associated with infectious bursal disease. *Journal of General Virology*, **20** : 369-375.

Amghrous S., Bedrani S. (2007). La compétitivité de l'aviculture algérienne. *Cahiers du CREAD (Les)*, 01/01/2007, n. 79-80, p. 53-76.

Aricibasi, M., Jung, A., Heller, E.D. & Rautenshlein, S. (2010). Differences in genetic background influence the induction of innate and acquired immune responses in chickens depending on the virulence of the infecting infectious bursal disease virus (IBDV) strain. *Vet. Immunol. Immunopathol*, **135** : 79-92

Azad, A. A., Jagadish, M. N., Brown, M. A. & Hudson, P. J. (1987). Deletion mapping and expression in *Escherichia coli* of the large genomic segment of a birnavirus. *Virology*, **161** : 145-152.

B

Bayliss, C. D., Spies, U., Shaw, K., Peters, R. W., Papageorgiou, A., Muller, H. & Bournnell, M. E. (1990). A comparison of the sequences of segment A of four infectious bursal disease virus strains and identification of a variable region in VP2. *J Gen Virol*, **71 (Pt 6)** : 1303-1312.

Bayliss, C.D., Peters, R.W., Cook, J.K., Reece, R.L., Howes, K., Binns, M.M. and Bournnell, M.E. (1991). A recombinant fowlpox virus that expresses the VP2 antigen of infectious bursal disease virus induces protection against mortality by the virus. *Archives of Virology*, **120** : 193-205.

Becht, H., Muller, H. & Muller, H. K. (1988). Comparative studies on structural and antigenic properties of two serotypes of infectious bursal disease virus. *J Gen Virol*, **69 (Pt 3)** : 631-640.

Benton, W. J., Cover, M. S., Rosenberger, J. K. & Lake, R. S. (1967). Physico-chemical properties of the infectious bursal agent (IBA). *Avian Dis*, **11** : 438-445.

Birghan, C., Mundt, E. & Gorbalenya, A. E. (2000). A non-canonical I α n proteinase lacking the ATPase domain employs the ser-Lys catalytic dyad to exercise broad control over the life cycle of a double-stranded RNA virus. *Embo J*, **19** : 114-123.

Böttcher, B., Kiselev, N. A., Stel'Mashchuk, V. Y., Perevozchikova, N. A., Borisov, A. V. & Crowther, R. A. (1997). Three-dimensional structure of infectious bursal disease virus determined by electron cryomicroscopy. *J Virol*, **71** : 325-330.

Boot, H. J., ter Huurne, A. H. & Peeters, B. P. (2000). Generation of full-length cDNA of the two genomic dsRNA segments of infectious bursal disease virus. *J Virol Methods*, **84** : 49-58.

Boot, H. J. & Pritz-Verschuren, S. B. (2004). Modifications of the 3'-UTR stem-loop of infectious bursal disease virus are allowed without influencing replication or virulence. *Nucleic Acids Res*, **32** : 211-222.

Brandt, M., Yao, K., Liu, M., Heckert, R.A., and Vakharia, V.N. (2001). Molecular determinants of virulence, cell tropism, and pathogenic phenotype of infectious bursal disease virus. *J Virol*, **75** : 11974-11982.

Bublot, M., Pritchard, N., Le Gros, F.X. and Goutebroze, S. (2007). Use of vectored vaccine against infectious bursal disease of chickens in the face of high-titred maternally derived antibody. *Journal of Comparative Pathology*, **137** : S81-S84.

Busnadiego, I., Maestre, A. M., Rodriguez, D., Rodriguez, J. F. (2012). The infectious bursal disease virus RNA-binding VP3 polypeptide inhibits PKR-mediated apoptosis. *PLoS ONE*, **7**:e46768 10.1371/journal.pone.0046768.

Références bibliographiques

Bumstead, N., Reece, R. L. & Cook, J. K. A. (1993). Genetic Differences in Susceptibility of Chicken Lines to Infection with Infectious Bursal Disease Virus. *Poultry Sci*, **72** : 403-410.

C

Cao, Y.C., Yeung, W.S., Law, M., Bi, Y.Z., Leung, F. C., and Lim, B.L. (1998). Molecular characterization of seven chinese isolates of infectious bursal disease virus: classical, very virulent, and variant strains. *Avian Dis*, **42** : 340-351.

Cao, Y.C., Shi, Q.C., Ma, J.Y., Xie, Q.M. and Bi, Y.Z. (2005). Vaccination against very virulent infectious bursal disease virus using recombinant T4 bacteriophage displaying viral protein VP2. *Acta Biochimica Biophysica Sinica (Shanghai)*, **37** : 657-664.

Caston, J. R., Martinez-Torrecuadrada, J. L., Maraver, A., Lombardo, E., Rodriguez, J. F., Casal, J. I. & Carrascosa, J. L. (2001). C terminus of infectious bursal disease virus major capsid protein VP2 is involved in definition of the T number for capsid assembly. *J Virol*, **75** :10815-10828.

Casañas, A., Navarro, A., Ferrer-Orta, C., Gonzalez, D., Rodriguez, J. F. & Verdaguer, N. (2008). Structural insights into the multifunctional protein VP3 of birnaviruses. *Structure*, **16** : 29-37.

Chang, C.F., and Hamilton, P.P. (1982). Increased severity and new symptoms of infectious bursal disease during aflatoxicosis in broiler chickens. *Poult. Sci*, **61** : 1061-1068.

Chen, F., Liu, J.J., Yan, Z.Q., Liu, D., Ji, J., Qin, J.P., Li, H.Y., MA, J.Y., BI, Y.Z., Xie, Q.M., (2012). Complete genome sequence analysis of a natural reassortant infectious bursal disease virus in China. *J Virol*, **86**: 11942-11943.

Chettle, N. J., Stuart, J. C. & Wyeth, P. J. (1989). Outbreak of virulent infectious bursal disease in East Anglia. *Veterinary Record*, **125** : 271-272.

Chevalier, C., Galloux, M., Pous, J., Henry, C., Denis, J., Da Costa, B., Navaza, J., Lepault, J. & Delmas, B. (2005). Structural peptides of a nonenveloped virus are involved in assembly and membrane translocation. *J Virol*, **79** : 12253-12263.

Chevalier, C., Lepault, J., Da Costa, B. & Delmas, B. (2004). The last C-terminal residue of VP3, glutamic acid 257, controls capsid assembly of infectious bursal disease virus. *J Virol*, **78** : 3296-3303.

Chevalier, C., Lepault, J., Erk, I., Da Costa, B. & Delmas, B. (2002). The maturation process of pVP2 requires assembly of infectious bursal disease virus capsids. *J Virol*, **76** : 2384-2392.

Cheville, N. F. (1967). Studies on the pathogenesis of gumboro disease in the bursa of Fabricius, spleen, and thymus of the chicken. *American Journal of Pathology*, **51** : 527-551.

Cho, Y. & Edgar, S. A. (1969). Characterization of the infectious bursal agent. *Poultry Science*, **48** : 2102-2109.

Cosgrove, A. S. (1962). An apparently new disease of chickens - avian nephrosis. *Avian Dis*, **6** : 385-389.

Coulibaly, F., Chevalier, C., Gutsche, I., Pous, J., Navaza, J., Bressanelli, S., Delmas, B. & Rey, F. A. (2005). The birnavirus crystal structure reveals structural relationships among icosahedral viruses. *Cell*, **120** : 761-772.

Cummings, T. S., Broussard, C. T., Page, R. K., Thayer, S. G. & Lukert, P. D. (1986). Infectious bursal disease virus in turkeys. *Veterinary Bulletin*, **56** : 757-762.

D

Da Costa, B., Chevalier, C., Henry, C., Huet, J. C., Petit, S., Lepault, J., Boot, H. & Delmas, B. (2002). The capsid of infectious bursal disease virus contains several small peptides arising from the maturation process of pVP2. *J Virol*, **76** : 2393-2402.

Darteil, R., Bublot, M., Laplace, E., Bouquet, J.F., Audonnet, J.C. & Riviere, M. (1995). Herpesvirus of turkey recombinant viruses expressing infectious bursal disease virus (IBDV) VP2 immunogen induce protection against an IBDV virulent challenge in chickens. *Virology*, **211** : 481-490.

Références bibliographiques

- Delgui, L., Ona, A., Gutierrez, S., Luque, D., Navarro, A., Caston, J. R. & Rodriguez, J. F. (2009).** The capsid protein of infectious bursal disease virus contains a functional alpha4beta1 integrin ligand motif. *Virology*, **386**(2):360-72. doi: 10.1016/j.virol.2008.12.036.
- Delgui, L.R., Rodriguez, J.F., and Colombo, M.I. (2013).** The endosomal pathway and the Golgi complex are involved in the Infectious Bursal Disease Virus life cycle. *J Virol*, **87** (16):8993-9007. doi: 10.1128/JVI.03152-12. Epub 2013 Jun 5.
- Dobos, P., Hill, B. J., Hallett, R., Kells, D. T., Becht, H. & Teninges, D. (1979).** Biophysical and biochemical characterization of five animal viruses with bisegmented double-stranded RNA genomes. *J Virol*, **32** : 593-605.
- Dobos, P. (1995).** Protein-primed RNA synthesis in vitro by the virion-associated RNA polymerase of infectious pancreatic necrosis virus. *Virology*, **208** :19-25.
- Dohms, J. E. & Jaeger, J. S. (1988).** The effect of infectious bursal disease virus infection on local and systemic antibody responses following infection of 3-week-old broiler chickens. *Avian Dis*, **32** : 632-640.
- Domanska, K., Mato, T., Rivallan, G., Smietanka, K., Minta, Z., de Boissesson, C., Toquin, D., Lomniczi, B., Palya, V. & Eterradossi, N. (2004).** Antigenic and genetic diversity of early European isolates of Infectious bursal disease virus prior to the emergence of the very virulent viruses: early European epidemiology of Infectious bursal disease virus revisited? *Arch Virol*, **149** : 465-480.
- Duncan, R., Mason, C. L., Nagy, E., Leong, J. A. & Dobos, P. (1991).** Sequence analysis of infectious pancreatic necrosis virus genome segment B and its encoded VP1 protein: a putative RNA-dependent RNA polymerase lacking the Gly-Asp-Asp motif. *Virology*, **181** : 541-552.
- E**
- Eldaghayes, I., Rothwell, L., Williams, A., Withers, D., Balu, S., Davison, F. & Kaiser, P. (2006).** Infectious bursal disease virus: strains that differ in virulence differentially modulate the innate immune response to infection in the chicken bursa. *Viral Immunol*, **19** : 83-91.
- Elankumaran, S., Heckert, R.A, and Moura, L. (2002).** Pathogenesis and tissue distribution of a variant strain of infectious bursal disease virus in commercial broiler chickens. *Avian Dis*, **46** : 169-176.
- Escaffre, O. (2011).** Bases moléculaires du pouvoir pathogène et développement d'une méthode de quantification différentielle des quatre brins génomiques chez l'*Avibirnavirus* de la Bursite infectieuse. Thèse de l'université Rennes 1. Ecole doctorale Vie-Agro-Santé.
- Escaffre, O., Le Nouën, C., Amelot, M., Ambroggio, X., Ogden, K.M., Guionie, O., Toquin, D., Müller, H., Islam, M.R., Eterradossi, N. (2013).** Both genome segments contribute to the pathogenicity of very virulent infectious bursal disease virus. *J.Virol*, **87** : 2767–2780.
- Eterradossi, N., Picault, J.P., Drouin, P., Guittet, M., L'Hospitalier, R., Bennejean, G. (1992).** Pathogenicity and preliminary antigenic characterization of six infectious bursal disease virus strains isolated in France from acute outbreaks. *Zentralbi Veterinarmed B*, **39** : 683-691.
- Eterradossi, N., Rivallan, G., Toquin, D. & Guittet, M. (1997).** Limited antigenic variation among recent infectious bursal disease virus isolates from France. *Arch Virol*, **142** : 2079-2087.
- Eterradossi, N., Arnould, C., Tekaiia, F., Toquin, D., Le Coq, H., Rivallan, G., Guittet, M., Domenech, J., van den Berg, T.P., & Skinner, M. A. (1999).** Antigenic and genetic relationships between European very virulent infectious bursal disease viruses and an early West African isolate, *Avian Pathol*, **28** (1) : 36-46, DOI: 10.1080/03079459995028
- Eterradossi, N., Gauthier, C., Reda, I., Comte, S., Rivallan, G., Toquin, D., De Boissesson, C., Lamande, J., Jestin, V., Morin, Y., Cazaban, C., and Borne, P.M. (2004).** Extensive antigenic changes in an atypical isolate of very virulent infectious bursal disease virus and experimental clinical control of this virus with an antigenically classical live vaccine. *Avian Pathol*, **33** : 423-431.
- Eterradossi, N., Arnould, C., Toquin, D. & Rivallan, G. (1998).** Critical amino acid changes in VP2 variable domain are associated with typical and atypical antigenicity in very virulent infectious bursal disease viruses. *Arch Virol*, **143** : 1627-1636.
- Eterradossi, N., & Saif, Y.M. (2013).** Infectious bursal disease. In D.E. Swayne, J.R. Glisson, L.R.

Références bibliographiques

McDougald, L.K. Nolan, D.L. Suarez & V.L. Nair (Eds.). *Diseases of Poultry 13th edn*, (pp. 219–246). Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell.

Etteradossi, N. (1995). Progress in the diagnosis and prophylaxis of infectious bursal disease (Gumboro disease) in poultry. *In Comprehensive Reports on Technical Items presented to the International Committee or to Regional Commissions*, pp 75-82 Paris: Office International des Epizooties.

F

Fahey, K.J., Erny, K., and Crooks, J. (1989). A conformational immunogen on VP-2 of infectious bursal disease virus that induces virus neutralizing antibodies that passively protect chickens. *J Gen Virol*, **70** (Pt6) : 1473-1481.

Fahey, K. J., McWaters, P., Brown, M. A., Erny, K., Murphy, V. J., and Hewish, D. R. (1991). Virus-neutralizing and passively protective monoclonal antibodies to infectious bursal disease virus in chickens. *Avian Dis*, **35** : 365–373.

Faragher, J. T. (1972). Infectious bursal disease of chickens. *Veterinary Bulletin*, **42** :361-369.

Faragher, J. T., Allan, W. H. & Wyeth, P. J. (1974). Immunosuppressive effect of infectious bursal agent on vaccination against newcastle disease. *Veterinary Record*, **95** : 385-388.

FAO, 2005. Rapport de l'élevage . www. FAO. org

Fernandez-Arias, A., Martinez, S. & Rodriguez, J. F. (1997). The major antigenic protein of infectious bursal disease virus, VP2, is an apoptotic inducer. *J Virol*, **71** : 8014-8018.

Flensburg, M. F., Ersboll, A. K. & Jorgensen, P. H. (2002). Risk factors associated with the introduction of acute clinical infectious bursal disease among Danish broiler chickens in 1998. *Avian Pathol*, **31** : 23-29.

Fodor, I., Horváth, E., Fodor, N., Nagy, E., Rencendorsh, A., Vakharia, V.N. and Dube, S.K. (1999). Induction of protective immunity in chickens immunised with plasmid DNA encoding infectious bursal disease virus antigens. *Acta Veterinaria Hungarica*, **47** : 481–492.

Francois, A., Chevalier, C., Delmas, B., Etteradossi, N., Toquin, D., Rivallan, G. and Langlois, P. (2004). Avian adenovirus CELO recombinants expressing VP2 of infectious bursal disease virus induce protection against bursal disease in chickens. *Vaccine*, **22** : 2351–2360.

G

Galloux, M., Libersou, S., Morellet, N., Bouaziz, S., Da Costa, B., Ouldali, M., Lepault, J. & Delmas, B. (2007). Infectious bursal disease virus, a non-enveloped virus, possesses a capsid-associated peptide that deforms and perforates biological membranes. *J Biol Chem*, **282** : 20774-20784.

Galloux, M., Libersou, S., Alves, I. D., Marquant, R., Salgado, G. F., Rezaei, H., Lepault, J., Delmas, B., Bouaziz, S. & Morellet, N. (2010). NMR structure of a viral peptide inserted in artificial membranes: a view on the early steps of the birnavirus entry process. *J Biol Chem*, **18**:285(25):19409-21. doi: 10.1074/jbc.M109.076083. Epub 2010 Apr 9.

Garriga, D., Navarro, A., Querol-Audi, J., Abaitua, F., Rodriguez, J. F. & Verdaguer, N. (2007). Activation mechanism of a noncanonical RNA-dependent RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104** : 20540-20545.

Gauthier-Clerc, M., Etteradossi, N., Toquin, D., Guittet, M., Kuntz, G., Le Maho, Y. (2002). Serological survey of the King penguin, *Aptenodytes patagonicus*, in Crozet Archipelagi for antibodies to infectious bursal disease, Influenza A and Newcastle disease viruses. *Polar Biol*, **25** : 316-319.

Goddard, R. D., Wyeth, P. J. & Varney, W. C. (1994). Vaccination of commercial layer chicks against infectious bursal disease with maternally derived antibodies. *Veterinary Record*, **135** : 273-274.

Gorbalenya, A. E., Pringle, F. M., Zeddani, J. L., Luke, B. T., Cameron, C. E., Kalkmakoff, J., Hanzlik, T. N., Gordon, K. H. & Ward, V. K. (2002). The palm subdomain-based active site is internally permuted in viral RNA-dependent RNA polymerases of an ancient lineage. *J Mol Biol*, **324** : 47-62.

Références bibliographiques

Granzow, H., Birghan, C., Mettenleiter, T. C., Beyer, J., Kollner, B. & Mundt, E. (1997). A second form of infectious bursal disease virus-associated tubule contains VP4. *J Virol*, **71** : 8879-8885.

H

Harkness, J. W., Alexander, D. J., Pattison, M. & Scott, A. C. (1975). Infectious bursal disease agent: morphology by negative stain electron microscopy. *Arch Virol*, **48** : 63-73.

Hassan, M.K., Afify, M and Aly, M.M. (2002). Susceptibility of vaccinated and unvaccinated Egyptian chickens to very virulent infectious bursal disease virus. *Avian Pathol*, **31** : 149-156.

He, C. Q., Ma, L. Y., Wang, D., Li, G. R. & Ding, N. Z. (2009). Homologous recombination is apparent in infectious bursal disease virus. *Virology*, **384** : 51-58.

Heine, H.G., and Boyle, D.B. (1993). Infectious bursal disease virus structural protein VP2 expressed by a fowlpox virus recombinant confers protection against disease in chickens. *Arch Virol*, **131** : 277-292.

Helmboldt, C. F. & Garner, E. (1964). Experimentally induced gumboro disease (IBA). *Avian Dis*, **8** : 561-575.

Henry, C.W., Brewer, R.N., Edgar, S.A. and Gray, B.W. (1980). Studies on infectious bursal disease in chickens. 2. Scoring microscopic lesions in the bursa of Fabricius, thymus, spleen and kidney in gnotobiotic and battery reared white Leghorns experimentally infected with infectious bursal disease virus. *Poult Sci*, **59** : 1006-1017.

Hitchner, S. B. (1970). Infectivity of infectious bursal disease virus for embryonating eggs. *Poult Sci*, **49** : 511-516.

Hirai, K., Shimakura, S. (1974). Structure of infectious bursal disease virus. *J Virol*, **14** : 957-964.

Hirai, K., and Calnek, B.W. (1979). In vitro replication of infectious bursal disease virus in established lymphoid cell lines and chicken B lymphocytes. *Infect Immun*, **25** : 964-970.

Hon, C. C., Lam, T. Y., Drummond, A., Rambaut, A., Lee, Y. F., Yip, C. W., Zeng, F., Lam, P. Y., Ng, P. T. & Leung, F. C. (2006). Phylogenetic analysis reveals a correlation between the expansion of very virulent infectious bursal disease virus and reassortment of its genome segment B. *J Virol*, **80** : 8503-8509.

Hon, C. C., Lam, T. T., Yip, C. W., Wong, R. T., Shi, M., Jiang, J., Zeng, F. & Leung, F. C. (2008). Phylogenetic evidence for homologous recombination within the family Birnaviridae. *J Gen Virol*, **89** : 3156-3164.

Howie, R. I. & Thorsen, J. (1981). Identification of a strain of infectious bursal disease virus isolated from mosquitoes. *Can J Comp Med*, **45** : 315-320.

Huang, Z., Elankumaran, S., Yunus, A. S. & Samal, S. K. (2004). A recombinant Newcastle disease virus (NDV) expressing VP2 protein of infectious bursal disease virus (IBDV) protects against NDV and IBDV. *J Virol*, **78** : 10054-10063.

Hudson, P. J., McKern, N. M., Power, B. E. & Azad, A. A. (1986). Genomic structure of the large RNA segment of infectious bursal disease virus. *Nucleic Acids Res*, **14** : 5001-5012.

Hulse, D.J. and Romero, C.H. (2004). Partial protection against infectious bursal disease virus through DNA-mediated vaccination with the VP2 capsid protein and chicken IL-2 genes. *Vaccine*, **22** : 1249-1259.

I

Ikuta, N., EL-Attrache, J., Villegas, P., Garcia, E.M., Lunge, V.R., Fonseca, A.S., Oliveira, C., Marques, E.K. (2001). Molecular characterization of Brazilian infectious bursal disease viruses. *Avian Dis*, **45**:297-306.

Ingrao, F., Rauw, F., Lambrecht, B., van den Berg, T. (2013). Infectious Bursal Disease: a complex host-pathogen interaction. *Dev. Comp. Immunol*, **41** : 429-438.

Inoue, M., Fukuda, M. & Miyano, K. (1994). Thymic lesions in chicken infected with infectious bursal disease virus. *Avian Dis*, **38** : 839-846.

Irigoyen, N., Caston, J.R., and Rodriguez, J.F. (2012). Host proteolytic activity is necessary for infectious bursal disease virus capsid protein assembly. *J Biol Chem*, **287** : 24473-24482.

Iván, J., Velhner, M., Ursu, K., Germán, P., Mató, T., Drén, C.N. and Mészáros, J. (2005). Delayed vaccine virus replication in chickens vaccinated subcutaneously with an immune

Références bibliographiques

complex infectious bursal disease vaccine: quantification of vaccine virus by real-time polymerase chain reaction. *Canadian Journal of Veterinary Research*, **69** : 135–142

J

- Jackwood D.J., Nielsen C.K. (1997).** Detection of infectious bursal disease viruses in commercially reared chickens using the reverse transcriptase/polymerase chain reaction-restriction endonuclease assay. *Avian Dis*, **41** : 137–143.
- Jackwood, D. J., Saif, Y. M. & Hughes, J. H. (1984).** Nucleic acid and structural proteins of infectious bursal disease virus isolates belonging to serotypes I and II. *Avian Dis*, **28** : 990-1006.
- Jackwood, D. H. & Saif, Y. M. (1987).** Antigenic diversity of infectious bursal disease viruses. *Avian Dis*, **31** : 766-770.
- Jackwood, D.J., Sommer, S.E. (2002).** Identification of infectious bursal disease virus quasispecies in commercial vaccines and field isolates of this double-stranded RNA virus. *Virology*, **304** :105–113.
- Jackwood, D. J. & Sommer-Wagner, S. (2007).** Genetic characteristics of infectious bursal disease viruses from four continents. *Virology*, **365** : 369-375.
- Jackwood, D. J., Sreedevi, B., LeFever, L. J. & Sommer-Wagner, S. E. (2008).** Studies on naturally occurring infectious bursal disease viruses suggest that a single amino acid substitution at position 253 in VP2 increases pathogenicity. *Virology*, **377** : 110-116.
- Jackwood, D.J. (2012).** Molecular epidemiologic evidence of homologous recombination in infectious bursal disease viruses. *Avian Dis*, **56** (3) : 574-577.
- Jackwood D.J., Spalding, B.D. and Sommer, S.E. (2003).** Real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction detection and analysis of nucleotide sequences coding for a neutralizing epitope on infectious bursal disease viruses. *Avian Dis*, **47** : 738-744.
- Jackwood, D.J., Stoute, S.T., and Crossley, B.M. (2016).** Pathogenicity of Genome Reassortant Infectious Bursal Disease Viruses in Chickens and Turkeys. *Avian Dis*, **60** (4) : 765-772.
- Jackwood, D.J., Sommer-Wagner, S.E., Crossley, B.M., Stoute, S.T., Woolcock, P.R., Charlton, B.R. (2011).** Identification and pathogenicity of a natural reassortant between a very virulent serotype 1 infectious bursal disease virus (IBDV) and a serotype 2 IBDV. *Virology*. **420**, 98-105.
- Jagdish, M.N., Staton, V.J., Hudson, P.J. and Azad, A.A. (1988).** Birnavirus precursor polyprotein is processed in *Escherichia coli* by its own virus-encoded polypeptide. *J. Virol*, **62** : 1084-1087.
- Jeon, W. J., Lee, E. K., Joh, S. J., Kwon, J. H., Yang, C. B., Yoon, Y. S. & Choi, K. S. (2008).** Very virulent infectious bursal disease virus isolated from wild birds in Korea: epidemiological implications. *Virus Res*, **137** : 153-156.
- Jeurissen, S.H., Janse, E.M., Lehrbach, P.R., Haddad, E.E., Avakian, A. and Whitfill, C.E. (1998).** The working mechanism of an immune complex vaccine that protects chickens against infectious bursal disease. *Immunology*, **95**: 494–500.

K

- Kasanga, C. J., Yamaguchi, T., Wambura, P. N., Munang'andu, H. M., Ohya, K. & Fukushi, H. (2008).** Detection of infectious bursal disease virus (IBDV) genome in free-living pigeon and guinea fowl in Africa suggests involvement of wild birds in the epidemiology of IBDV. *Virus Genes*, **36** : 521-529.
- Khatri, M., Palmquist, J.M., Cha, R.M. and Sharma, J.M. (2005).** Infection and activation of bursal macrophages by virulent infectious bursal disease virus. *Virus Research*, **113**: 44-50
- Kibenge, F. S., Nagarajan, M. M. & Qian, B. (1996).** Determination of the 5' and 3' terminal noncoding sequences of the bi-segmented genome of the avibirnavirus infectious bursal disease virus. *Arch Virol*, **141** : 1133-1141.
- Kibenge, F. S., Dhillon, A. S. & Russell, R. G. (1988).** Biochemistry and immunology of infectious bursal disease virus. *J Gen Virol*, **69** (Pt 8) : 1757-1775.
- Kibenge, F. S., Jackwood, D. J. & Mercado, C. C. (1990).** Nucleotide sequence analysis of genome segment A of infectious bursal disease virus. *J Gen Virol*, **71** (Pt 3) : 569-577.

Références bibliographiques

- Kibenge, F. S. & Dhama, V. (1997).** Evidence that virion-associated VP1 of avibirnaviruses contains viral RNA sequences. *Arch Virol*, **142** : 1227-1236.
- Kim, I.J. & Sharma, J.M. (2000).** IBDV-induced bursal T lymphocytes inhibit mitogenic response of normal splenocytes. *Vet Immunol Immunopathol*, **74** : 47-57.
- Kim, I.J., You, S.K., Kim, H., Yeh, H.Y., and Sharma, J.M. (2000).** Characteristics of bursal T lymphocytes induced by infectious bursal disease virus. *J Virol*, **74** : 8884-8892.
- Kim, I. J., Gagic, M. & Sharma, J. M. (1999).** Recovery of antibody-producing ability and lymphocyte repopulation of bursal follicles in chickens exposed to infectious bursal disease virus. *Avian Dis*, **43** : 401-413.
- Kong, L. L., Omar, A. R., Hair-Bejo, M., Aini, I. & Seow, H. F. (2004).** Sequence analysis of both genome segments of two very virulent infectious bursal disease virus field isolates with distinct pathogenicity. *Arch Virol*, **149** : 425-434.
- Kosters, J., Becht, H. and Rudolph, R. (1972).** Properties of the infectious bursal agent of chicken (IBA). *Zeitschrift für Medizinische Mikrobiologie and Immunologie und immunologie*, **157** : 291-298.
- Kumar, K., Singh, K.C.P. & Prasad, C.B. (2000).** Immune responses to intermediate strain IBD vaccine at different levels of maternal antibody in broiler chickens. *Tropical Animal Health and Production*, **32** (6) : 357-360.
- Kurukulasuriya S, Ahmed KA, Ojkic D, Gunawardana T, Gupta A, Goonewardene K. (2016).** Circulating strains of variant infectious bursal disease virus may pose a challenge for antibiotic-free chicken farming in Canada. *Res Vet Sci*, **108** : 54-9.
- Kusk, M., Kabell, S., Jorgensen, P. H. & Handberg, K. J. (2005).** Differentiation of five strains of infectious bursal disease virus: development of a strain-specific multiplex PCR. *Vet Microbiol*, **109** : 159-167.
- L**
- Lana, D.P., Beisel, C.E., and Silva, R.F. (1992).** Genetic mechanisms of antigenic variation in infectious bursal disease virus: analysis of naturally occurring variant virus. *Virus Genes*, **6**: 247-259.
- Lasher, H. N. & Shane, S. M. (1994).** Infectious bursal disease. *World's Poultry Science Journal*, **50** : 133-166.
- Le Gros, F.X., Dancer, A., Giacomini, C., Pizzoni, L., Bublot, M., Graziani, M. and Prandini, F. (2009).** Field efficacy trial of a novel HVT-IBD vector vaccine for 1-day-old broilers. *Vaccine*, **22** : 592-596.
- Le Nouen, C. (2006).** Etude de l'épidémiologie moléculaire du segment B de l'Avibirnavirus de la Bursite Infectieuse Aviaire et bases moléculaires de la virulence chez ce virus. *Thèse de l'université Claude Bernard-Lyon I*.
- Le Nouen, C., Rivallan, G., Toquin, D. & Etteradossi, N. (2005).** Significance of the genetic relationships deduced from partial nucleotide sequencing of infectious bursal disease virus genome segments A or B. *Arch Virol*, **150** : 313-325.
- Le Nouen, C., Rivallan, G., Toquin, D., Darlu, P., Morin, Y., Beven, V., de Boisseson, C., Cazaban, C., Comte, S., Gardin, Y. & Etteradossi, N. (2006).** Very virulent infectious bursal disease virus: reduced pathogenicity in a rare natural segment-B-reassorted isolate. *J Gen Virol*, **87** : 209-216.
- Le Nouën, C., Toquin, D., Müller, H., Raue, R., Kean, KM., Langlois, P., Cherbonnel, M., Etteradossi, N., (2012).** Different domains of the RNA polymerase of infectious bursal disease virus contribute to virulence. *PLoS One*, **7**:e28064. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028064>
- Lee, S-W., Markham, P.F., Coppo, M.J., Legione, A.R., Markham, J.F., Noormohammadi, A.H., Browning, G.F., Ficorilli, N., Hartley, C.A., Devlin, J.M. (2012).** Attenuated vaccines can recombine to form virulent field viruses. *Science*, **337** : 188.
- Lee S-W., Devlin J.M., Markham J.F., Noormohammadi A.H., Browning G.F., Ficorilli N.P., Hartley, C.A., Markham, P.F. (2013).** Phylogenetic and Molecular Epidemiological Studies Reveal Evidence of Multiple Past Recombination Events between Infectious Laryngotracheitis Viruses. *PLoS ONE*, **8**(2): e55121. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055121>

Références bibliographiques

- Lejal, N., Da Costa, B., Huet, J. C. & Delmas, B. (2000). Role of Ser-652 and Lys-692 in the protease activity of infectious bursal disease virus VP4 and identification of its substrate cleavage sites. *J Gen Virol*, **81** : 983-992.
- Letzel, T., Coulibaly, F., Rey, F. A., Delmas, B., Jagt, E., van Loon, A. A. & Mundt, E. (2007). Molecular and structural bases for the antigenicity of VP2 of infectious bursal disease virus. *J Virol*, **81** : 12827-12835.
- Li, J., Liang, X., Huang, Y., Meng, S., Xie, R., Deng, R. and Yu, L. (2004). Enhancement of the immunogenicity of DNA vaccine against infectious bursal disease virus by co-delivery with plasmid encoding chicken interleukin 2. *Virology*, **329** : 89–100.
- Li, L., Fang, W., Li, J., Huang, Y. & Yu, L. (2006). Oral DNA vaccination with the polyprotein gene of infectious bursal disease virus (IBDV) delivered by the attenuated Salmonella elicits protective immune responses in chickens. *Vaccine*, **24** : 5919 – 5927.
- Li, K., Courtillon, C., Guionie, O., Allee, C., Amelot, M., Qi, X., Gao, Y., Wang, X. & Eterradossi, N. (2015). Genetic, antigenic and pathogenic characterization of four infectious bursal disease virus isolates from China suggests continued evolution of very virulent viruses. *Infect. Genet. Evol.*, **30** : 120–127.
- Li, J., Huang, Y., Liang, X., Lu, M., Li, L., Yu, L. and Deng, R. (2003). Plasmid DNA encoding antigens of infectious bursal disease viruses induce protective immune responses in chickens: factors influencing efficacy. *Virus Research*, **98** : 63–74.
- Li, Z., Wang, Y., Xue, Y., Li, X., Cao, H., Zheng, S.J. (2012). Critical role for voltage-dependent anion channel 2 in infectious bursal disease virus-induced apoptosis in host cells via interaction with VP5. *J. Virol*, **86** : 1328-1338.
- Lim, B. L., Cao, Y., Yu, T. & Mo, C. W. (1999). Adaptation of very virulent infectious bursal disease virus to chicken embryonic fibroblasts by site-directed mutagenesis of residues 279 and 284 of viral coat protein VP2. *J Virol*, **73** : 2854-2862.
- Lin, W., Zhang, Z., Xu, Z., Wang, B., Li, X., Cao, H., Wang, Y., Zheng, S.J. (2015). The Association of Receptor of Activated Protein Kinase C 1(RACK1) with Infectious Bursal Disease Virus Viral Protein VP5 and Voltage-dependent Anion Channel 2 (VDAC2) Inhibits Apoptosis and Enhances Viral Replication. *Journal of Biological Chemistry*, **290** : 8500-8510. doi: 10.1074/jbc.M114.585687
- Lin, T. W., Lo, C. W., Lai, S. Y., Fan, R. J., Lo, C. J., Chou, Y. M., Thiruvengadam, R., Wang, A. H. & Wang, M. Y. (2007). Chicken heat shock protein 90 is a component of the putative cellular receptor complex of infectious bursal disease virus. *J Virol*, **81** : 8730-8741.
- Liu H., Zhang M., Han H., Yuan J., Li Z. (2010). Comparison of the expression of cytokine genes in the bursal tissues of the chickens following challenge with infectious bursal disease viruses of varying virulence. *Virol. J*, **7** : 364.
- Liu, M. & Vakharia, V. N. (2004). VP1 protein of infectious bursal disease virus modulates the virulence in vivo. *Virology*, **330** : 62-73.
- Lombardo, E., Maraver, A., Espinosa, I., Fernandez-Arias, A. & Rodriguez, J. F. (2000). VP5, the nonstructural polypeptide of infectious bursal disease virus, accumulates within the host plasma membrane and induces cell lysis. *Virology*, **277** : 345-357.
- Lombardo, E., Maraver, A., Cast n, J. R., Rivera, J., Fernandez-Arias, A., Serrano, A., Carrascosa, J. L. & Rodriguez, J. F. (1999). VP1, the putative RNA-dependent RNA polymerase of infectious bursal disease virus, forms complexes with the capsid protein VP3, leading to efficient encapsidation into virus-like particles. *J Virol*, **73** : 6973-6983.
- Lucio, B. & Hitchner, S.B. (1980). Response of mibolerone-treated chickens to infectious bursal disease virus. *Avian Dis*, **24** : 334-344.
- Lukert, P. D. & Davis, R. B. (1974). Infectious bursal disease virus: growth and characterization in cell cultures. *Avian Dis*, **18** : 243-250.
- Lukert, P. D. & Saif, Y. M. (2003). Infectious Bursal Disease. *Infectious bursal disease In: Diseases of Poultry, 11th edn (Eds Barnes, H J, Glisson, J R, Fadly, A M, McDouglad, L R, Swayne, D E), Iowa State University Press, Iowa*, 161-180.
- Lukert, P. D., Leonard, J. & Davis, R. B. (1975). Infectious bursal disease virus: antigen production and immunity. *Am J Vet Res*, **36** : 539-540.

Références bibliographiques

- Lunger, P. D. & Maddux, T. C. (1972). Fine-structure studies of the avian infectious bursal agent. I. In vivo viral morphogenesis. *Avian Dis*, **16** : 874-893.
- Luo, J., Zhang, G. P., Fan, J. M., Teng, M., You, L. M., Zhou, L., Deng, R. G., Wang, X. N., Yang, Y. Y., Wang, L., Xing, G. X. & Cheng, N. (2009). Infectivity and propagation of attenuated infectious bursal disease virus in the chicken B-lymphocyte cell line DT40. *Arch Virol*, **154** : 513-517.
- Luo, J., Zhang, H., Teng, M., Fan, J.M., You, L.M., Xiao, Z.J., Yi, M.L., Zhi, Y.B., Li, X.W., and Zhang, G.P. (2010). Surface IgM on DT40 cells may be a component of the putative receptor complex responsible for the binding of infectious bursal disease virus. *Avian Pathol*, **39** : 359-365.
- Luque, D., Saugar, I., Rodriguez, J. F., Verdager, N., Garriga, D., Martin, C. S., Velazquez-Muriel, J. A., Trus, B. L., Carrascosa, J. L. & Caston, J. R. (2007). Infectious bursal disease virus capsid assembly and maturation by structural rearrangements of a transient molecular switch. *J Virol*, **81** : 6869-6878.
- Luque, D., Rivas, G., Alfonso, C., Carrascosa, J. L., Rodriguez, J. F. & Caston, J. R. (2009a). Infectious bursal disease virus is an icosahedral polypliod dsRNA virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106** : 2148-2152.
- Luque, D., Saugar, I., Rejas, M. T., Carrascosa, J. L., Rodriguez, J. F. & Caston, J. R. (2009b). Infectious Bursal disease virus: ribonucleoprotein complexes of a double-stranded RNA virus. *J Mol Biol*, **386** : 891-901.
- Lutticken, D., A.A.W.M.van Loon and M.J.H.S.de Vries. (1994). Determination of the breakthrough titre of IBDvaccines or IBD challenge strains in MDA+chickens. In *Proceedings of the International Symposium on Infectious Bursal Disease and Chicken Infectious Anaemia. Rauschholzhausen, Germany*, p 272-278
- M**
- MAFF report 1961-1962: Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries report.
- Mahardika, G.N., and Becht, H. (1995). Mapping of cross-reacting and serotype-specific epitopes on the VP3 structural protein of the infectious bursal disease virus (IBDV). *Arch Virol*, **140** : 765-774.
- Mahmood, M.S., Hussain, I., Siddique, M., Akhtar, M. and Ali, S. (2007). DNA vaccination with VP2 gene of very virulent infectious bursal disease virus (vvIBDV) delivered by transgenic *E. coli* DH5alpha given orally confers protective immune responses in chickens. *Vaccine*, **25** : 7629-7635.
- Maraver, A., Clemente, R., Rodriguez, J. F. & Lombardo, E. (2003). Identification and molecular characterization of the RNA polymerase-binding motif of infectious bursal disease virus inner capsid protein VP3. *J Virol*, **77** : 2459-2468.
- Martin, A.M., Fallacara, F., Barbieri, I., Tosi, G., Rivallan, G., Eterradosi, N. & Cordioli, P. (2007). Genetic and antigenic characterization of infectious bursal disease viruses isolated in Italy during the period 2002-2005. *Avian Dis*, **51** : 863-872.
- Mazariegos, L.A., Lukert, P.D. & Brown, J. (1990). Pathogenicity and immunosuppressive properties of infectious bursal disease "intermediate" strains. *Avian Dis*, **34** : 203-208.
- McAllister, J.C., Steelman, C.D., Newberry, L.A., and Skeeles, J.K. (1995). Isolation of infectious bursal disease virus from the lesser mealworm, *Alphitobius diaperinus* (Panzer). *Poult. Sci*, **74** : 45-49.
- McFerran, J. B., McNulty, M. S., McKillop, E. R., Connor, T. J., McCracken, R. M., Collins, D. S. & Allan, G. M. (1980). Isolation and serological studies with infectious bursal disease viruses from fowl, turkeys and ducks: demonstration of a second serotype. *Avian Pathol*, **9** : 395-404.
- Méndez, F., Romero, N., Cubas, L.L., Delgui, L.R., Rodríguez, D., Rodríguez, J.F. (2017). Non-Lytic Egression of Infectious Bursal Disease Virus (IBDV) Particles from Infected Cells. *PLoS ONE*, **12**(1): e0170080. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170080>

Références bibliographiques

- Méndez, F., de Garay, T., Rodríguez, D., Rodríguez, JF. (2015). Infectious Bursal Disease Virus VP5 Polypeptide: A Phosphoinositide-Binding Protein Required for Efficient Cell-to-Cell Virus Dissemination. *PLoS ONE*, **10**(4): e0123470. doi:10.1371/journal.pone.0123470
- Michel, L.O. & Jackwood, D.J. (2017). Classification of infectious bursal disease virus into genogroups *Arch Virol*. <https://doi.org/10.1007/s00705-017-3500-4>
- Morgan, M. M., Macreadie, I. G., Harley, V. R., Hudson, P. J. & Azad, A. A. (1988). Sequence of the small double-stranded RNA genomic segment of infectious bursal disease virus and its deduced 90-kDa product. *Virology*, **163** : 240-242.
- Moyer, C.L., Nemerow, G.R. (2011). Viral weapons of membrane destruction: Variable modes of membrane penetration by non-enveloped viruses. *Curr. Opin. Virol*, **1** : 44–49. doi: 10.1016/j.coviro.2011.05.002.
- Müller, H. & Becht, H. (1982). Biosynthesis of virus-specific proteins in cells infected with infectious bursal disease virus and their significance as structural elements for infectious virus and incomplete particles. *J Virol*, **44** : 384-392.
- Müller, H. & Nitschke, R. (1987). The two segments of the infectious bursal disease virus genome are circularized by a 90,000-Da protein. *Virology*, **159** : 174-177.
- Müller, H., Mundt, E., Etteradossi, N. & Islam, M.R. (2012). Review: current status of vaccines against infectious bursal disease. *Avian Pathol*, **41** : 133–139.
- Müller, H., Scholtissek, C. & Becht, H. (1979). The genome of infectious bursal disease virus consists of two segments of double-stranded RNA. *J Virol*, **31** : 584-589.
- Mündt, E. & Müller, H. (1995). Complete nucleotide sequences of 5'- and 3'-noncoding regions of both genome segments of different strains of infectious bursal disease virus. *Virology*, **209** : 10-18.
- Mundt, E. (1999). Tissue culture infectivity of different strains of infectious bursal disease virus is determined by distinct amino acids in VP2. *J Gen Virol*, **80 (Pt 8)** : 2067-2076.
- Mundt, E., Beyer, J. & Muller, H. (1995). Identification of a novel viral protein in infectious bursal disease virus-infected cells. *J Gen Virol*, **76 (Pt 2)** : 437-443.
- Muskett, J.C., Hopkins, I.G., Edwards, K.R. & Thornton, D.H. (1979). Comparison of two infectious bursal disease vaccine strains: efficacy and potential hazards in susceptible and maternally immune birds. *Veterinary Record*, **104** :332-334.
- N**
- Nagarajan, M. M. & Kibenge, F. S. (1997). The 5'-terminal 32 basepairs conserved between genome segments A and B contain a major promoter element of infectious bursal disease virus. *Arch Virol*, **142** : 2499-2514.
- Nieper, H. & Muller, H. (1996). Susceptibility of chicken lymphoid cells to infectious bursal disease virus does not correlate with the presence of specific binding sites. *J Gen Virol*, **77 (Pt 6)** : 1229-1237.
- Nick, H., Cursiefen, D. & Becht, H. (1976). Structural and growth characteristics of infectious bursal disease virus. *J Virol*, **18** : 227-234.
- Nwagbo, IO., Shittu, I., Nwosuh, CI., Ezeifeke, GO., Odibo, FJ., Michel, LO., Jackwood, DJ. (2016). Molecular characterization of field infectious bursal disease virus isolates from Nigeria. *Vet World*, **9** : 1420–1428.
- O**
- Ogawa, M., Yamaguchi, T., Setiyono, A., Ho, T., Matsuda, H., Furusawa, S., Fukushi, H. & Hirai, K. (1998). Some characteristics of a cellular receptor for virulent infectious bursal disease virus by using flow cytometry. *Arch Virol*, **143** : 2327-2341.
- Ona, A., Luque, D., Abaitua, F., Maraver, A., Caston, J. R. & Rodriguez, J. F. (2004). The C-terminal domain of the pVP2 precursor is essential for the interaction between VP2 and VP3, the capsid polypeptides of infectious bursal disease virus. *Virology*, **322** : 135-142.
- Öppling, V.,H. Mtoller, and H. Becht, (1991). Heterogeneity of the antigenic site responsible for the induction of neutralizing antibodies in infectious bursal disease virus. *Arch Virol*. **119** : 211-223.
- Owoade, A.A., M.N. Mulders, J. Kohnen, W. Ammerlaan, and C.P. Müller . (2004). High

Références bibliographiques

sequence diversity in infectious bursal disease virus serotype 1 in poultry and turkey suggests West-African origin of very virulent strains . *Arch. Virol.* **149** : 653– 672.

P

- Pan, J., Vakharia, V. N. & Tao, Y. J. (2007).** The structure of a birnavirus polymerase reveals a distinct active site topology. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104** : 7385-7390.
- Pan, J., Lin, L. & Tao, Y. J. (2009).** Self-guanylation of birnavirus VP1 does not require an intact polymerase activity site. *Virology*, **395** : 87-96.
- Pages-Mante, A., Torrents, D., Maldonado, J. & Saubi, N. (2004).** Dogs as potential carriers of infectious bursal disease virus. *Avian Pathol*, **33** : 205-209.
- Park, J.H., Sung, H.W., Yoon, B.I. and Kwon, H.M. (2009).** Protection of chicken against very virulent IBDV provided by in ovo priming with DNA vaccine and boosting with killed vaccine and the adjuvant effects of plasmid-encoded chicken interleukin-2 and interferon-gamma. *Journal of Veterinary Science*, **10** : 131–139.
- Pejkovski, C., Davelaar, F. G. & Kouwenhoven, B. (1979).** Immunosuppressive effect of infectious bursal disease virus on vaccination against infectious bronchitis. *Avian Pathol*, **8** : 95-106.
- Perozo, F., Villegas, A. P., Fernandez, R., Cruz, J., & Pritchard, N. (2009).** Efficacy of single dose recombinant herpesvirus of turkey infectious bursal disease virus (IBDV) vaccination against a variant IBDV strain. *Avian Dis*, **53** : 624-628.
- Pitcovski, J., Gutter, B., Gallili, G., Goldway, M., Perelman, B., Gross, G., Krispel, S., Barbakov, M. and Michael, A. (2003).** Development and large-scale use of recombinant VP2 vaccine for the prevention of infectious bursal disease of chickens. *Vaccine*, **21** : 4736–4743.
- Prandini, F., Simon, B., Jung, A., Poppel, M., Lemiere, S. and Rautenschlein, S. (2016).** Comparison of infectious bursal disease live vaccines and a hvt-ibd vector vaccine and their effects on the immune system of commercial layer pullets. *Avian Pathol*, **45** : 114-125.

Q

- Qi, X., Gao, H., Gao, Y., Qin, L., Wang, Y., Gao, L., Wang, X. (2009).** Naturally occurring mutations at residues 253 and 284 in VP2 contribute to the cell tropism and virulence of very virulent infectious bursal disease. *Antiviral Research*, **84** : 225–233.
- Qin, L., Qi, X., Gao, Y., Gao, H., Lu, X., Wang, Y., Bu, Z. & Wang, X. (2010).** VP5-deficient mutant virus induced protection against challenge with very virulent infectious bursal disease virus of chickens. *Vaccine*, **28** : 3735-3740.
- Qin, Y., Xu, Z., Wang, Y., Li, X., Cao, H., and Zheng, S.J. (2017).** VP2 of Infectious Bursal Disease Virus Induces Apoptosis via Triggering Oral Cancer Overexpressed 1 (ORAOV1) Protein Degradation. *Front. Microbiol*, **8** : 1351. doi: 10.3389/fmicb.2017.01351
- Qin, Y., Zheng, S.J. (2017).** Infectious Bursal Disease Virus-Host Interactions: Multifunctional Viral Proteins that Perform Multiple and Differing Jobs. *Int. J. Mol. Sci*, **18** : 161; doi:10.3390/ijms18010161

R

- Raue, R., Islam, M.R., Islam, M.N., Islam, K.M., Badhy, S.C., Das, P.M., Muller, H. (2004).** Reversion of molecularly engineered, partially attenuated, very virulent infectious bursal disease virus during infection of commercial chickens. *Avian pathol*, **33** : 181-189.
- Rauf, A., Khatri, M., Murgia, M.V., Jung, K., Saif, Y.M. (2011).** Differential modulation of cytokine, chemokine and Toll like receptor expression in chickens infected with classical and variant infectious bursal disease virus. *Vet Res*, **42** : 85.
- Rautenschlein, S., Yeh, H. Y., Njenga, M. K. & Sharma, J. M. (2002).** Role of intrabursal T cells in infectious bursal disease virus (IBDV) infection: T cells promote viral clearance but delay follicular recovery. *Arch Virol*, **147** : 285-304.
- Rautenschlein, S., Yeh, H. Y. & Sharma, J. M. (2003).** Comparative Immunopathogenesis of Mild, Intermediate, and Virulent Strains of Classic Infectious Bursal Disease Virus. *Avian Dis*, **47** : 66-78.

Références bibliographiques

- Rautenschlein, S., Kraemer, C., Vanmarcke, J., and Montiel, E. (2005).** Protective efficacy of intermediate and intermediate plus infectious bursal disease virus (IBDV) vaccines against very virulent IBDV in commercial broilers. *Avian Dis*, **49** : 231-7.
- Rong, J., Jiang, T., Cheng, T., Shen, M., Du, Y., Li, S., Wang, S., Xu, B. and Fan, G. (2007).** Large-scale manufacture and use of recombinant VP2 vaccine against infectious bursal disease in chickens. *Vaccine*, **25** : 7900–7908.
- Rose, D.M., Han, J., Ginsberg, M.H. (2002).** $\alpha 4$ integrins and the immune response. *Immunol.Rev*, **18** : 118–124.
- Rosenberger, J. K. & Cloud, S. S. (1986).** Isolation and characterization of variant infectious bursal disease viruses. *Journal American Veterinary Medical Association*, **189** : 357.
- Rosenberger, J. K., Cloud, S. S. & Metz, A. L. (1987).** Use of infectious bursal disease virus variant vaccines in broilers and broiler breeders. *Proceedings of the 36th Western Poultry Disease Conference, California*, 105-109.
- Ruby, T., Whittaker, C., Withers, D. R., Chelbi-Alix, M. K., Morin, V., Oudin, A., Young, J. R. & Zoorob, R. (2006).** Transcriptional profiling reveals a possible role for the timing of the inflammatory response in determining susceptibility to a viral infection. *J Virol*, **80** : 9207-9216.
- S**
- Sanchez, A. B. & Rodriguez, J. F. (1999).** Proteolytic processing in infectious bursal disease virus: identification of the polyprotein cleavage sites by site-directed mutagenesis. *Virology*, **262** : 190-199.
- Sapats, S.I., and Ignjatovic, J. (2000).** Antigenic and sequence heterogeneity of infectious bursal disease virus strains isolated in Australia. *Arch Virol*, **145** : 773-785.
- Schröder, A., Van loon, A. A., Goovaerts, D., Teifke, J. P., Mundt, E. (2001).** VP5 and the N terminus of VP2 are not responsible for the different pathotype of serotype I and II infectious bursal disease virus. *J. Gen. Virol*, **82** : 159-169.
- Schnitzler, D., Bernstein, F., Muller, H. & Becht, H. (1993).** The genetic basis for the antigenicity of the VP2 protein of the infectious bursal disease virus. *J Gen Virol*, **74 (Pt 8)** : 1563-1571.
- Sharma, J. M., Kim, I. J., Rautenschlein, S. & Yeh, H. Y. (2000).** Infectious bursal disease virus of chickens: pathogenesis and immunosuppression. *Dev Comp Immunol*, **24** : 223-235.
- Sharma, J. M., Dohms, J. E. & Metz, A. L. (1989).** Comparative pathogenesis of serotype 1 and variant serotype 1 isolates of infectious bursal disease virus and their effect on humoral and cellular immune competence of specific-pathogen-free chickens. *Avian Dis*, **33** : 112-124.
- Shaw, I. & Davison, T.F. (2000).** Protection from IBDV-induced bursal damage by a recombinant fowlpox vaccine, fpIBD1, is dependent on the titre of challenge virus and chicken genotype. *Vaccine*, **18** : 3230-3241.
- Shin, T. S., Allaudin, Z. N., Lila, M. A., Rahman, S. O. (2014).** Disparity of apoptotic response in human breast cancer cell lines MCF-7 and MDA-MB-231 after infection with recombinant adenovirus encoding the VP2 gene of infectious bursail disease virus]. *Mol. Biol. (Mosk)*, **48** : 133–141.
- Shwed, P. S., Dobos, P., Cameron, L. A., Vakharia, V. N. & Duncan, R. (2002).** Birnavirus VP1 proteins form a distinct subgroup of RNA-dependent RNA polymerases lacking a GDD motif. *Virology*, **296** : 241-250.
- Silva, P.S., Vidigal, P.M., Myrrha, L.W., Fietto, J.L., Silva, A.J., Almeida, M.R. (2013).** Tracking the molecular epidemiology of Brazilian Infectious bursal disease virus (IBDV) isolates. *Infect Genet Evol*, **13C** : 18-26.
- Sivanandan, V. & Maheswaran, S.K. (1980).** Immune profile of infectious bursal disease. I. Effect on infectious bursal disease virus on peripheral blood T and B lymphocytes in chickens. *Avian Dis*, **24** : 715–725.
- Skehel, J. J. & Joklik, W. K. (1969).** Studies on the in vitro transcription of reovirus RNA catalyzed by reovirus cores. *Virology*, **39** : 822-831.
- Skeeles, J.K., Lukert, P.D., De Buyscher, E.V., Fletcher, O.J. & Brown, J. (1979).** Infectious bursal disease viral infections. II. The relation-ship of age, complement levels, virus-neutralizing antibody, clotting, and lesions. *Avian Dis*, **23** : 107-117.

Références bibliographiques

- Skeeles, J. K., Slavik, M., Beasley, J. N., Brown, A. H., Meinecke, C. F., Maruca, S. & Welsh, S. (1980).** An age-related coagulation disorder associated with experimental infection with infectious bursal disease virus. *American Journal of Veterinary Research*, **41** : 1458-1461.
- Snyder, D. B., Vakharia, V. N. & Savage, P. K. (1992).** Naturally occurring-neutralizing monoclonal antibody escape variants define the epidemiology of infectious bursal disease virus in the United States. *Archives of Virology*, **127** : 89-101.
- Snyder, D. B., Vakharia, V.N., Meengel-Whereat, S.A., Edwards, G.H., Savage, P.K., Luticken, D., and Goodwin, M.A. (1994).** Active cross-protection induced by a recombinant baculovirus expressing chimeric infectious bursal disease virus structural proteins. *Avian Dis*, **38** : 701-707.
- Soubies, S.M., Courtillon, C., Abed, M., Amelot, M., Keita, A., Broadbent, A., Härtle, S., Kaspers, B., Eterradossi, N. (2017).** Propagation and Titration of Infectious Bursal Disease Virus, Including Non-Cell-Culture-Adapted Strains, Using Ex Vivo Stimulated Chicken Bursal Cells. *Avian Path*, **47** (2) : 179-188. doi: 10.1080/03079457.2017.1393044.
- Spies, U., Muller, H. & Becht, H. (1989).** Nucleotide sequence of infectious bursal disease virus genome segment A delineates two major open reading frames. *Nucleic Acids Res*, **17** : 7982.
- Spies, U., Muller, H. & Becht, H. (1987).** Properties of RNA polymerase activity associated with infectious bursal disease virus and characterization of its reaction products. *Virus Res*, **8** : 127-140.
- Sun, J.H., Yan, Y.X., Jiang, J. and Lu, P. (2005).** DNA immunization against very virulent infectious bursal disease virus with VP2-4-3 gene and chicken IL-6 gene. *Journal of Veterinary Medicine*, **B 52** : 1-7.

T

- Tacken, M. G., Peeters, B. P., Thomas, A. A., Rottier, P. J. & Boot, H. J. (2002).** Infectious bursal disease virus capsid protein VP3 interacts both with VP1, the RNA-dependent RNA polymerase, and with viral double-stranded RNA. *J Virol*, **76** : 11301-11311.
- Tacken, M. G., Rottier, P. J., Gielkens, A. L. & Peeters, B. P. (2000).** Interactions in vivo between the proteins of infectious bursal disease virus: capsid protein VP3 interacts with the RNA-dependent RNA polymerase, VP1. *J Gen Virol*, **81** : 209-218.
- Tanimura, N., Sharma, J.M. (1998).** In-situ apoptosis in chickens infected with infectious bursal disease virus. *J. Comp. Pathol*, **118** : 15-27
- Tanimura, N., Tsukamoto, K., Nakamura, K., Narita, M. & Maeda, M. (1995).** Association between pathogenicity of infectious bursal disease virus and viral antigen distribution detected by immunohistochemistry. *Avian Dis*, **39** : 9-20.
- Taraporewala, Z.F., Jiang, X., Vasquez-Del Carprio, R., Jayaram, H., Prasad, B.V., Patton, J.T. (2006).** Structure function analysis of Rotavirus NSP2 octamer by using a novel complementation system, *J. Virol*, **80** : 7984-7994.
- Tomás, G., Hernández, M., Marandino, A., Techera, C., Grecco, S., Hernández, D., Banda, A., Panzera, Y & Pérez, R. (2016).** Development of an RT-qPCR assay for the specific detection of a distinct genetic lineage of the infectious bursal disease virus, *Avian Pathol*, **46** (2) :150-156, DOI: 10.1080/03079457.2016.1228827
- Tsukamoto, N., Saito, S., Saeki, S., Sato, T., Tanimura, N., Isobe, T., Mase, M., Imada, T., Yuasa, N and Yamaguchi, S. (2002).** Complete, long-term protection against lethal infectious bursal disease virus challenge by single vaccination with an avian herpesvirus vector expressing VP2 antigens. *J Virol*, **76** : 5637-5645.

V

- Vakharia, V.N., Snyder, D.B., He, J., Edwards, G.H., Savage, P.K. and Mengel-Whereat, S.A. (1993).** Infectious bursal disease virus structural proteins expressed in a baculovirus recombinant confer protection in chickens. *Journal of General Virology*, **74** : 1201-1206.
- Van den Berg, T. P., Gonze, M. & Meulemans, G. (1991).** Acute infectious bursal disease in poultry: isolation and characterization of a highly virulent strain. *Avian Pathol*, **20** : 133-143.

Références bibliographiques

- Van den Berg, T. P., Gonze, M., Morales, D. & Meulemans, G. (1996).** Acute infectious bursal disease in poultry: immunological and molecular basis of antigenicity of a highly virulent strain. *Avian Pathol*, **25** : 751–768.
- Van den Berg, T. P., Morales, D., Eterradossi, N., Rivallan, G., Toquin, D., Raue, R., Zierenberg, K., Zhang, M. F., Zhu, Y. P., Wang, C. Q., Zheng, H. J., Wang, X., Chen, G. C., Lim, B. L. & Muller, H. (2004).** Assessment of genetic, antigenic and pathotypic criteria for the characterization of IBDV strains. *Avian Pathol*, **33** : 470-476.
- Van Loon, A. A., de Haas, N., Zeyda, I. & Mundt, E. (2002).** Alteration of amino acids in VP2 of very virulent infectious bursal disease virus results in tissue culture adaptation and attenuation in chickens. *J Gen Virol*, **83** : 121-129.
- Vervelde, L., Davison, T.F. (1997).** Comparison of the in situ changes in lymphoid cells during infection with infectious bursal disease virus in chickens of different ages. *Avian Pathol*, **26** : 803–821.
- Vindevogel, H., Gouffaux, M., Meulemans, G., Duchatal, J. P. & Halen, P. (1976).** Maladie de gumboro: distribution et persistance du virus chez le poisson inoculé. Etudes sur la transmission de la maladie. *Avian Pathol*, **5** : 31-38.
- Von Einem, U. I., Gorbalenya, A. E., Schirrmeier, H., Behrens, S. E., Letzel, T. & Mundt, E. (2004).** VP1 of infectious bursal disease virus is an RNA-dependent RNA polymerase. *J Gen Virol*, **85** : 2221-2229.
- W**
- Wang, Y., Qi, X., Gao, H., Gao, Y., Lin, H., Song, X., Pei, L. & Wang, X. (2009).** Comparative study of the replication of infectious bursal disease virus in DF-1 cell line and chicken embryo fibroblasts evaluated by a new real-time RT-PCR. *J Virol Methods*, **157** (2) : 205-10
- Wang, Y., Qi, X., Kang, Z., Yu, F., Qin, L., Gao, H., Gao, Y., Wang, X. (2010).** A single amino acid in the C-terminus of VP3 protein influences the replication of attenuated infectious bursal disease virus in vitro and in vivo. *Antiviral. Res.* **87** (2) : 223-9.
- Wang, Y. S., Wang, Z. C., Tang, Y. D., Shi, Z. L., He, K. W., Li, Y., Hou, J. B., Yao, H. C., Fan, H. J. & Lu, C. P. (2007).** Comparison of four infectious bursal disease viruses isolated from different bird species. *Arch Virol*, **152** : 1787-1797.
- Wei, Y., Li, J., Zheng, J., Xu, H., Li, L. & Yu, L. (2006).** Genetic reassortment of infectious bursal disease virus in nature. *Biochem Biophys Res Commun*, **350** : 277-287.
- Wei, Y., Yu, X., Zheng, J., Chu, W., Xu, H. T., Yu, X. & Yu, L. (2008).** Reassortant infectious bursal disease virus isolated in China. *Virus Res*, **131** : 279-282.
- Wei, L., Hou, L., Zhu, S., Wang, J., Zhou, J., Liu, J. (2011).** Infectious bursal disease virus activates the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt signaling pathway by interaction of VP5 protein with the p85 alpha subunit of PI3K. *Virology*, **417** : 211-220.
- Wit, J.J.D and de Wit, J.J. (1999).** Gumboro disease : optimising vaccination. *Int Poultry Prod*, **7** : 19-21.
- Winterfield, R. W. & Hitchner, S. B. (1962).** Etiology of an infectious nephritis-nephrosis syndrome of chickens. *American Journal of Veterinary Research*, **23** : 1273-1279.
- Winterfield, R. W., S. B.Hitchner, G.S. Appleton, and Cosgrove, A.S. (1962).** Avian nephrosis, nephritis, and Gumboro disease. *L & M News Views* **3**, 103.
- Winterfield, R. W., Fadley, A. M. & Bickford, A. (1972).** Infectivity and distribution of infectious bursal disease virus in chicken. persistence of the virus and lesions. *Avian Dis*, **16** : 622-632.
- Winterfield, R. W., F.J. Hoerr, and A. M. Fadly. (1978).** Vaccination against infectious bronchitis and immunosuppressive effects of infectious bursal disease. *Poult Sci*, **57** : 386-39.
- Williams, A. E. & Davison, T. F. (2005).** Enhanced immunopathology induced by very virulent infectious bursal disease virus. *Avian Pathol*, **34** : 4-14.
- Wu, C.C., Lin, T.L., Zhang, H.G., Davis, V.S. and Boyle, J.A. (1992).** Molecular detection of infectious bursal disease virus by polymerase chain reaction. *Avian Dis*, **36** : 221-226.
- Wu, H., Singh, N.K., Locy, R.D., Scissum-Gunn, K. and Giambrone, J.J. (2004).** Immunization of chickens with VP2 protein of infectious bursal disease virus expressed in *Arabidopsis thaliana*. *Avian Dis*, **48** : 663–668.

Références bibliographiques

Wyeth, P. J. & Cullen, G. A. (1976). Maternally derived antibody- effect on susceptibility of chicks to infectious bursal disease. *Avian Pathol.* **5** : 253-260.

X

Xu, H. T., Si, W. D. & Dobos, P. (2004). Mapping the site of guanylation on VP1, the protein primer for infectious pancreatic necrosis virus RNA synthesis. *Virology*, **322** : 199-210.

Xu, X.G., Tong, D.W., Wang, Z.S., Zhang, Q., Li, Z.C., Zhang, K., Li, W, and Liu, H.J. (2011). Baculovirus virions displaying infectious bursal disease virus VP2 protein protect chickens against infectious bursal disease virus infection. *Avian Dis*, **55** (2) : 223–229.

Y

Yamada, S., Matuso, K., Uchinuno, Y. (1982). Susceptibility of ducks and duck-origin cell cultures to infectious bursal disease virus. *Avian Dis*, **26** (3) : 396-601.

Yamaguchi, T., Setiyono, A., Kobayashi, M., Takigami, S., Fukushi, H., Hirai, K. (2000). Infectious bursal disease live vaccines: changes in the virus population during serial passage in chickens and chicken embryo fibroblast cells. *Avian dis*, **44** : 284-290.

Yamaguchi, T., Iwata, K., Kobayashi, M., Ogawa, M., Fukushi, H., and Hirai, K. (1996). Epitope mapping of capsid proteins VP2 and VP3 of infectious bursal disease virus. *Arch Virol*, **141**: 1493-1507.

Yamazaki, K., Ohta, H., Kawai, T., Yamaguchi, T., Obi, T., Takase, K. (2017). Characterization of variant infectious bursal disease virus from a broiler farm in Japan using immunized sentinel chickens. *J. Vet. Med. Sci*, **79** (1) : 175–183.

Yao, K., Goodwin, M. A. & Vakharia, V. N. (1998). Generation of a mutant infectious bursal disease virus that does not cause bursal lesions. *J Virol*, **72** : 2647-2654.

Yip, C.W., Hon, C.C., Zeng, F., Leung, F.C. (2012). Cell culture-adapted IBDV uses endocytosis for entry in DF-1 chicken embryonic fibroblasts. *Virus Res*, **165** : 9-16.

Yu, F., Ren, X., Wang, Y., Qi, X., Song, J., Gao, Y., Qin, L., Gao, H., and Wang, X. (2013). A single amino acid V4I substitution in VP1 attenuates virulence of very virulent infectious bursal disease virus (vvIBDV) in SPF chickens and increases replication in CEF cells. *Virology*, **440** : 204-209.

Z

Zhang, M. F., Huang, G. M. & Qiao, S. (2002). Early stages of infectious bursal disease virus infection in chickens detected by in situ reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Avian Pathol*, **31** : 593-597.

Zierenberg, K., Raue, R., Nieper, H., Islam, M. R., Eterradossi, N., Toquin, D. & Muller, H. (2004). Generation of serotype 1/serotype 2 reassortant viruses of the infectious bursal disease virus and their investigation in vitro and in vivo. *Virus Res* .**105** : 23-34.

Abstract:

Infectious bursal disease (IBD) is an immunosuppressive viral disease, present worldwide, which causes mortality and immunosuppression in young chickens. The causative agent, the *Avibirnavirus* IBDV, is a non-enveloped virus whose genome consists of two segments (A and B) of double-stranded RNA. Different pathotypes of IBDV exist, ranging from attenuated vaccine strains to very virulent viruses (vvIBDV). In Algeria, despite the prophylactic measures implemented, cases of IBD are still often diagnosed clinically and the current molecular epidemiology of IBDV remains unknown. The presence of the virus and especially of strains genetically close to vvIBDV was confirmed in 2000 by an unpublished OIE report. In this study, nineteen IBDV isolates were collected in Algeria between September 2014 and September 2015 during clinical outbreaks. These isolates were analyzed at the genetic, antigenic and pathogenic levels. Our results reveal a broad genetic and phenotypic diversity of pathogenic IBDV strains in Algeria, with, i) the circulation of viruses with both genome segments related to European vvIBDV, which proved as pathogenic for specific pathogen-free chickens as vvIBDV reference strain, ii) the circulation of viruses closely related - yet with a specific segment B - to European vvIBDV, their pathogenicity being lower than reference vvIBDV, iii) the detection of reassortant viruses whose segment A was related to vvIBDV whereas their segment B did not appear closely related to any reference sequence. Interestingly, the pathogenicity of these potentially reassortant strains was comparable to that of reference vvIBDV. All strains characterized in this study exhibited an antigenicity similar to the cognate reference IBDV strains. These data reveal the continuous genetic evolution of IBDV strains in Algerian poultry through reassortment and acquisition of genetic material of unidentified origin. Continuous surveillance of the situation as well as good vaccination practice associated with appropriate biosecurity measures are necessary for disease control.

Keywords:

Infectious bursal disease virus, Evolution, Antigenicity, Pathogenicity, Reassortant, Algeria

Résumé :

La bursite infectieuse aviaire (IBD) est une maladie virale, immunosuppressive et très contagieuse, présente dans le monde entier. Elle provoque de la mortalité et de l'immunosuppression chez les jeunes poulets. L'agent causal, l'IBDV est un *Avibirnavirus*. C'est un virus non enveloppé dont le génome est constitué de deux segments (A et B) d'ARN double brin. Différents pathotypes d'IBDV existent, allant des souches vaccinales atténuées à des souches très virulentes (vvIBDV). En Algérie, malgré les mesures de prophylaxie mises en place, les cas de l'IBD sont souvent diagnostiqués cliniquement et l'épidémiologie moléculaire de l'IBDV reste inconnue. La présence du virus et en particulier de souches génétiquement proches de vvIBDV a été confirmée en 2000 par un rapport non publié de l'OIE. Dans notre étude, dix-neuf isolats d'IBDV ont été collectés en Algérie entre septembre 2014 et septembre 2015 lors de suspicion de cas cliniques. Le profil génétique, antigénique et pathotypique de ces isolats a été analysé. Nos résultats révèlent une grande diversité génétique et phénotypique des souches d'IBDV pathogènes en Algérie, avec, i) la circulation continue des virus apparentés aux vvIBDV européens et asiatiques depuis au moins 1999 et qui présentent une pathogénicité similaire à celle de la souche vvIBDV de référence ii) la circulation actuelle de virus encore étroitement apparentés au vvIBDV européen avec une pathogénicité inférieure à celle de la souche vvIBDV de référence iii) la détection de virus réassortants avec un segment A apparenté aux vvIBDV européens et asiatiques et un segment B d'origine inconnue qui n'est lié à aucune séquence de référence. Il est intéressant de noter que la pathogénicité de ces souches potentiellement réassortantes est comparable à celle de la souche de référence vvIBDV. Toutes les souches caractérisées dans cette étude présentent un profil antigénique similaire aux souches IBDV de référence apparentées. Ces données révèlent évolution génétique continue des souches d'IBDV dans les élevages de volailles Algériens par le réassortiment et l'acquisition de matériel génétique d'origine non identifiée. Une surveillance continue de la situation ainsi que de bonnes pratiques de vaccination associées à des mesures de biosécurité appropriées sont nécessaires pour lutter contre la maladie.

Mots clés :

Virus de la bursite infectieuse aviaire, Evolution, Antigénicité, Pathogénicité, Réassortissant, Algérie