

UNIVERSITE SAAD DAHLAB DE BLIDA-1

Institut des Sciences Vétérinaires

THESE DE DOCTORAT

En sciences vétérinaires

Spécialité : Elevage et pathologie avicole

**ETUDE EPIDEMIOLOGIQUE, HISTOPATHOLOGIQUE ET MOLECULAIRE DE
LA MALADIE DE GUMBORO SUR DES ELEVAGES AVICOLES D'UNE
REGION DE L'ALGERIE**

Par

Mourad BECHEUR

Devant le jury composé de :

N. MENOUEI	Professeur, ISV de Blida1	Président
Dj. KHELEF	Professeur, ENSV ALGER	Examineur
M. AKKOU	M.C.A, ISV de Blida1	Examineur
H. KHALED	M.C.A, ISV de Blida1	Examineur
M. OUMOUNA	Professeur, U. de MEDEA	Directeur
K. BENACHOUR	Professeur, U. de MEDEA	Co-directrice

Blida, 15 Mai 2025

RESUME

La maladie de Gumboro, ou bursite infectieuse (IBD), est une maladie virale aiguë et hautement contagieuse qui affecte les jeunes poulets. Elle se caractérise par un syndrome hémorragique, des lésions sévères de la bourse de Fabricius, une immunosuppression et une forte mortalité, survenus généralement entre 3 et 6 semaines d'âge. La présente étude a été réalisée pour déterminer les caractéristiques moléculaires et les effets histopathologiques du virus de la bursite infectieuse (IBDV) isolé à partir de quelques élevages de poulets de chair et de poulettes dans l'Est et le Centre de l'Algérie. Cinquante-cinq sujets provenant de onze élevages avicoles ont été examinés suite à des suspicions d'IBD sur une période s'étalant de 2019 à 2020. Seules les volailles présentant des signes cliniques et des lésions macroscopiques indiquant l'IBD ont été sélectionnées pour un examen histopathologique et des investigations moléculaires utilisant la méthode RT-PCR suivie d'un séquençage. Exception faite pour le cheptel N° 4, tous les sujets de l'étude ont montré des lésions microscopiques de l'IBD qui se résumaient à une déplétion lymphocytaire, un œdème interstitiel et une infiltration de macrophages et d'hétérophiles. La RT-PCR a confirmé l'infection par l'IBDV dans les échantillons des élevages N° 1, 2, 3, 9, 10 et 11. Un séquençage a permis de détecter une souche hautement virulente de l'IBDV (vvIBDV) dans les échantillons des élevages N° 10 et 11. Les souches identifiées présentaient quatre acides aminés conservés (222A, 256I, 294I et 299S), caractéristiques du vvIBDV. Selon l'arbre phylogénétique, les deux souches de l'étude étaient étroitement liées aux vvIBDVs isolés les années précédentes dans diverses régions du pays et se regroupaient ensemble. Ce résultat pourrait expliquer l'échec fréquent des vaccinations contre la maladie de Gumboro observé dans les cheptels de poulets de chair et de poulettes en Algérie.

Mots clés : Bursite infectieuse, caractérisation, séquençage, histopathologie, vvIBDV, poulets, Algérie.

ملخص

مرض جمبورو، أو البورسيت المعدية (IBD)، هو مرض فيروسي حاد شديد العدوى يصيب الدجاج الصغير. يتميز بمتلازمة نزفية، وأضرار شديدة في بورصة فابريسيوس، وتثبيط مناعي، ومعدل وفيات مرتفع، وعادة ما يحدث بين الأسبوع الثالث والسادس من العمر. أجريت هذه الدراسة لتحديد الخصائص الجزيئية والآثار النسيجية لفيروس بورسيت المعدية (IBDV) المعزول من بعض مزارع الدجاج اللحم والدجاج البياض في شرق ووسط الجزائر. تم فحص خمسة وخمسين عينة من إحدى عشرة مزرعة دواجن بعد شكوك في الإصابة بمرض جمبورو خلال الفترة من 2019 إلى 2020. تم اختيار فقط الدواجن التي تظهر علامات سريرية وتغيرات مرضية مرئية تشير إلى مرض جمبورو لإجراء فحص نسيجي وفحوصات جزيئية باستخدام طريقة RT-PCR تليها التسلسل النوكليوتيدي. باستثناء القطيع رقم 4، أظهرت جميع عينات الدراسة آفات مجهرية لمرض جمبورو والتي تتمثل بشكل أساسي في نقص الخلايا الليمفاوية، وتورم في الأنسجة، وتجمع للخلايا البلعمية والخلايا المحبة للحبيبات. أكدت تقنية RT-PCR الإصابة بفيروس IBDV في عينات من المزارع رقم 1، 2، 3، 9، 10، و11. كشف التسلسل النوكليوتيدي عن وجود سلالة شديدة الضراوة من فيروس (vvIBDV) IBDV في عينات من المزارع رقم 10 و11. تحتوي السلالات المحددة على أربعة أحماض أمينية محفوظة (222A، 256I، 294I و 299S)، وهي سمة من سمات vvIBDV. وفقاً للشجرة النسلية، كانت السلالتان المدروستان مرتبطتان ارتباطاً وثيقاً بسلالات vvIBDV المعزولة في السنوات السابقة في مناطق مختلفة من البلاد وتجمعتا معاً. قد تفسر هذه النتيجة الفشل المتكرر للتلقيح ضد مرض جمبورو الذي لوحظ في قطعان الدجاج اللحم والدجاج البياض في الجزائر.

الكلمات المفتاح:

البورسيت المعدية، تحديد الخصائص، التسلسل النوكليوتيدي، الفحص النسيجي، vvIBDV، الدجاج، الجزائر.

ABSTRACT

Infectious bursal disease (IBD) or Gumboro disease is an acute, highly contagious viral disease of young chickens characterised by haemorrhagic syndrome, severe damage in the cloacal bursa, immunosuppression, and high mortality, generally at 3–6 weeks of age. The present study was performed to investigate the molecular characteristics and histopathological effects of infectious bursal disease virus (IBDV) isolated from broiler and pullet flocks in eastern and central Algeria. Fifty-five chickens collected from eleven broiler and pullet farms were investigated for IBD outbreaks over the period of 2019–2020. Only the birds with clinical signs and macroscopic lesions indicating IBD were selected for histopathological examination and molecular investigations using reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) followed by sequencing. Except for Flock No4, all the birds in the study showed microscopic lesions of IBD which included lymphocyte depletion, interstitial edema, and infiltration of macrophages and heterophils. RT-PCR confirmed IBDV infection in samples from flocks No1, 2, 3, 9, 10, and 11. Using sequencing, a very virulent IBDV (vvIBDV) strain was detected in samples No10 and 11. The studied strains exhibited four conserved amino acids (222A, 256I, 294I, and 299S), characteristic of vvIBDV. According to the phylogenetic tree, the two strains in the study were closely related to previously isolated vvIBDVs and clustered together. This result may explain the frequent vaccine failure against IBD observed in broiler and pullet flocks in Algeria.

Keywords: IBD, characterization, sequencing, histopathology, vvIBDV, chickens, Algeria.

REMERCIEMENTS

Louanges à Dieu Clément et Miséricordieux, Le Détenteur du savoir. Puisse-t-Il toujours me guider sur le droit chemin.

Je tiens à exprimer mes remerciements les plus sincères à mon Directeur de thèse, **Professeur Oumouna Mustapha**. Depuis notre première rencontre, où nous avons discuté de la problématique de mon Magister, jusqu'à aujourd'hui, à l'approche de ma soutenance de thèse de Doctorat, plusieurs années se sont écoulées. Le temps a confirmé ma conviction d'avoir eu la chance inestimable de travailler sous votre direction. Votre soutien moral m'a aidé à surmonter des épreuves personnelles particulièrement difficiles, notamment la pandémie du Covid et le décès de ma mère. Vous avez toujours fait preuve d'une grande compréhension en facilitant les démarches administratives liées à mes réinscriptions, malgré des contraintes de force majeure ayant retardé ma soutenance. Vos remarques avisées et vos encouragements constants ont grandement contribué à la réussite de mon parcours en post-graduation. Vos qualités humaines et scientifiques resteront profondément gravées dans ma mémoire. Recevez ici, Professeur, l'expression de ma gratitude infinie et de mon respect profond.

Je remercie également **Professeur K. Oumouna-Benachour**, co-Directrice de thèse, pour son aide et son soutien tout au long de la réalisation de ce travail. Prière de trouver ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude envers **Professeur N. Menoueri**, de l'ISV de Blida, pour avoir accepté de présider le jury de ma soutenance. Votre présence et vos remarques éclairées enrichiront sans aucun doute ce moment important de mon parcours académique.

Ma reconnaissance va également à **Professeur D. Khelef**, de l'ENSV d'Alger, pour avoir accepté d'examiner ce travail. Vos commentaires enrichissants et votre expertise en seront d'une grande valeur pour l'amélioration de ce manuscrit.

Je souhaite exprimer ma gratitude à **Dr M. Akkou**, MCA à l'ISV de Blida, pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse. Vos remarques pertinentes et constructives contribueront sans aucun doute à améliorer la qualité de cette thèse.

Je suis très reconnaissant envers **Dr H. Khaled**, MCA à l'ISV de Blida, pour sa participation en tant que membre du jury. Votre expertise et vos observations avisées seront d'un apport précieux pour enrichir et améliorer ce travail.

Je tiens à exprimer ma plus profonde gratitude à **Dr Husam Bakri**, manager d'un prestigieux laboratoire en Jordanie et expert de renommée internationale en aviculture, pour son accueil généreux et son soutien inestimable. Vous m'avez offert l'opportunité précieuse de réaliser des analyses de biologie moléculaire dans un laboratoire européen de renom, tout en rendant ce séjour mémorable par votre bienveillance et votre sens inégalé de l'hospitalité. Toujours fidèle à votre art de joindre l'utile à l'agréable, vous avez eu la délicatesse de préparer vous-même le célèbre plat "المقلوبة", qui restera gravé dans ma mémoire comme l'une des meilleures spécialités orientales que j'ai eu le privilège de savourer.

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à **Mme Entisar El Halaq**, spécialiste en biologie moléculaire, qui travaillait sous la direction du Dr Husam Bakri. Grâce à votre bienveillance, j'ai eu l'opportunité de visiter les différents compartiments de votre laboratoire et de participer à des manipulations. Vous m'avez permis d'assister aux étapes d'extraction d'ARN du virus de la Gumboro à partir de cartes FTA, prélevées sur des foyers inclus dans cette étude, ainsi qu'aux manipulations de RT-PCR en temps réel, une technique de pointe couramment utilisée dans ce laboratoire ultramoderne. Votre compétence remarquable et votre générosité sont tout simplement indescriptibles. Puisse Allah vous accorder Ses bénédictions et vous offrir toutes les beautés de cette vie.

Je tiens également à remercier **Rana**, une biologiste d'une bonté sans égale, dont l'attitude chaleureuse m'a profondément marqué. Mes pensées vont aussi à **سائدة**, qui nous a quittés prématurément après une longue maladie. Son immense générosité et les leçons d'arabe jordanien qu'elle s'efforçait de m'enseigner resteront gravées à jamais dans ma mémoire. Puisse Allah, dans Sa miséricorde infinie, lui accorder une place dans Son vaste Paradis.

Je tiens à adresser mes remerciements les plus sincères à **Dr Lounas Aziz** pour son aide précieuse dans l'interprétation des résultats de séquençage et pour le soutien moral

indéfectible qu'il m'a témoigné tout au long de ce parcours. Puisse Allah vous combler de tous Ses bienfaits et exaucer vos souhaits les plus chers.

Je remercie également **Dr Omar Messaoudi** pour l'assistance inestimable qu'il m'a apportée dans la manipulation du logiciel de biologie moléculaire MEGA et dans l'interprétation des résultats. Veuillez accepter ici l'expression de ma profonde gratitude et de mon respect.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude aux **vétérinaires de terrain** qui m'ont grandement facilité la tâche pour réaliser des autopsies et des prélèvements sur des cas suspectés de Gumboro. Certains d'entre eux ont même pris l'initiative d'effectuer ces actes par eux-mêmes quand mon déplacement sur le lieu du foyer était difficile à effectuer. Je souhaite citer et remercier chaleureusement **Dr Ouriache Slimane, Dr Denni Noureddine, Dr Becetti Fouad, Dr Hiba Noudjoud, Dr Benabdelouaheb Nadjat et Dr Benouarab Faycal**. Veuillez tous trouver ici l'expression de mes sincères remerciements pour votre dévouement et votre précieuse collaboration.

Mes remerciements vont également au **Professeur Nadir Alloui**, dont les encouragements constants ont été une source de motivation inestimable. Vous avez su m'apporter votre aide dans un moment critique de mon parcours doctoral. Puisse Allah vous accorder santé et longue vie pour continuer à inspirer et guider d'autres générations.

À mon très cher frère, **Dr Abdelhamid Becheur**, je te suis infiniment reconnaissant pour le soutien indéfectible que tu m'as apporté, y compris ton aide précieuse dans l'élaboration de ce document, en particulier pour tout ce qui concerne la gestion de la base de données Zotero. Puisse Allah te combler de santé, de bonheur et de toutes les belles choses de la vie.

Je tiens à remercier du fond du cœur mes amis et collègues : **Professeur Ziane Mohamed, Professeur Saidi Radhwane, Dr Mokhtar Rahmani Mohamed, Dr Gacem Amine et Professeur Houicher Abderrahmane**. Votre aide, votre soutien et vos encouragements ont été pour moi une source de force et d'inspiration. Je vous en suis profondément reconnaissant.

À mes chers proches, **Gaci Fouad et Boucetta Karim**, je tiens à exprimer ma reconnaissance la plus profonde. Votre aide précieuse, après celle de Dieu, a été essentielle

à l'aboutissement de ce travail. Sans votre soutien indéfectible, ce projet n'aurait jamais pu voir le jour. Puisse Allah vous récompenser pour votre générosité et votre bienveillance.

Je ne pourrais jamais oublier une personne qui m'est profondément chère et qui a été d'un soutien inestimable tout au long de ce long parcours doctoral : mon cher ami et collègue, **Dr Laouadi Mourad**. Par tes multiples contributions, qu'il s'agisse de relectures, de mises en forme ou de conseils avisés, tu n'as cessé de m'encourager et de me pousser à donner le meilleur de moi-même. Ta rigueur exemplaire et ton souci du travail bien fait ont été pour moi une source d'inspiration constante. Que Dieu exauce tous tes vœux et t'accorde santé, bonheur et prospérité.

Enfin, il m'est impossible de trouver des mots à la hauteur de ma gratitude et de ma reconnaissance envers mon très cher ami et frère, **Idir Mechoub**. Tu as consacré d'innombrables heures et journées pour m'aider avec patience et dévouement à la mise en forme de cette thèse. Je me souviendrai toujours de ces longues soirées passées ensemble à peaufiner les derniers détails de ce manuscrit. Ta capacité à trouver des solutions à tous les problèmes rencontrés a été un véritable atout. Puisse Allah te protéger, toi ainsi que ta famille, et t'accorder tout ce que ton cœur désire dans cette vie.

DEDICACES

À la mémoire de ma très chère mère Khadidja Metahri et à celle de mon très cher père Abderrahim Becheur,

Vous êtes les piliers de ma vie, et c'est en imaginant l'immense fierté et joie que vous auriez ressenties en me voyant soutenir ma thèse de Doctorat que j'ai trouvé la force d'aller jusqu'au bout. Vos sacrifices, votre amour inconditionnel et vos efforts pour notre bien-être ont été le moteur de mon parcours. Soyez assurés que tout ce que j'ai accompli est le fruit de vos enseignements et de vos prières. Vous vivrez éternellement dans mon cœur.

Puisse Allah, dans Sa Miséricorde infinie, vous accueillir en Son vaste Paradis et vous accorder la récompense de tout le bien que vous avez semé dans nos vies.

A mon épouse. Pour ton soutien, ta compréhension, ta compassion et ta patience.

À mes enfants, Hadil, Maroua et Mehdi,

Il est enfin temps de rattraper tout ce que j'ai dû reporter. Les excuses comme "*Attendez que je termine mon article*" ou "*Patiencez jusqu'à ce que je finisse ma thèse*" n'auront désormais plus lieu d'être ! Je me réjouis à l'idée de vous accompagner dans les lieux que vous aimez et de partager avec vous les loisirs qui vous tiennent à cœur. Vous avez été ma source de joie et de motivation tout au long de ce parcours, et maintenant, c'est à mon tour de vous consacrer beaucoup plus de mon temps.

À la mémoire de mon beau-père, Cheikh El Hacène Gaci : Que Dieu, dans Sa Clémence infinie, t'enveloppe de Sa grande Miséricorde.

À la mémoire de mon oncle paternel, Hadj Belkacem : Puisse Allah t'accueillir dans Son vaste Paradis.

À la mémoire de mes grands-parents, maternels et paternels, ainsi qu'à celle de tous mes proches disparus : Que Dieu vous accorde Sa Clémence et Sa Miséricorde.

À mes frères, Mohamed, Abdelhamid, et Ali, à mes sœurs, Zakia, Djouher, et Souad, ainsi qu'à leurs époux et épouses : Que les liens sacrés qui nous unissent continuent de

fortifier notre famille. Recevez ici l'expression de mes sentiments fraternels les plus sincères.

À ma belle-mère, Nana "Y", et à toute ma belle-famille : Merci pour votre soutien constant et vos encouragements précieux.

À mes neveux et nièces : En témoignage de mon affection, je vous exhorte à aller encore plus loin que moi et à cultiver l'humilité dans toutes les étapes de votre vie.

À tous les membres des familles Becheur et Metahri : Recevez l'expression de mon estime la plus profonde.

À tous mes amis et collègues, si nombreux que je ne pourrais vous nommer individuellement : Je vous adresse mes sentiments amicaux les plus sincères.

A mon Maître de toujours Dr Nadir Bensegueni,

Votre art d'enseigner, votre raisonnement médical éclairé et votre approche scientifique unique ont éveillé en nous une véritable passion pour les sciences et la médecine vétérinaires. Les années passées sous votre enseignement, tant à l'amphithéâtre qu'à l'hôpital de l'école vétérinaire, resteront gravées dans ma mémoire comme une source d'inspiration intarissable. Ces moments ont profondément marqué mon parcours et représentent une dette immense que seule votre bienveillance pourrait excuser de ne jamais pouvoir pleinement honorer.

TABLE DES MATIERES

RESUME	1
REMERCIEMENTS	4
DEDICACES	8
TABLE DES MATIERES	10
LISTE DES ILLUSTRATIONS.....	13
LISTE DES TABLEAUX	15
INTRODUCTION.....	16
CHAPITRE 1 ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE SUR LE VIRUS DE LA MALADIE DE GUMBORO (IBDV)	20
1-1 Définition.....	20
1-2 Classification	20
1-3 Morphologie de l'IBDV.....	20
1-4 Génome de l'IBDV	21
1-5 Les protéines virales	22
1.6 Les sérotypes de l'IBDV	23
1.7 Evolution moléculaire et épidémiologique du virus de la Gumboro.....	24
1.7.1 Situation aux États-Unis.....	24
1.7.2 Situation en Europe.....	25
1.7.3 Distribution mondiale des vvIBDV	26
1.7.4 Mécanismes par lesquels le virus de la Gumboro évolue	26
1.8 Identification et caractérisation du virus de la Gumboro	27
1.8.1 Techniques sérologiques pour détecter l'antigène viral de l'IBD	27
1.8.1.1 Immunodiffusion sur gélose (IDG).....	27
1.8.1.1.1 Principe	27
1.8.1.1.2 Application dans le diagnostic de la maladie de Gumboro (IBDV).....	28
1.8.1.2 Séroneutralisation.....	28
1.8.1.2.1 Principe du Test de Neutralisation Virale (VN)	29
1.8.1.2.2 Application dans le Cas du Virus de la Gumboro (IBDV).....	30
1.8.1.3 Test ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) indirect.....	30
1.8.1.3.1 Principe du Test ELISA indirect.....	31
1.8.1.3.2 Application dans le Cas du Virus de la Gumboro (IBDV).....	31
1.8.2 Techniques moléculaires (pour détecter le génome de l'IBDV)	32
1.8.2.1 But de la technique.....	32
1.8.2.2 Etapes de la RT-PCR.....	32
1.8.2.2.1 Transcription inverse (RT)	32
1.8.2.2.2 Amplification en chaine (PCR)	33
1.8.3 Quelques données bibliographiques sur l'intérêt de la RT-PCR et d'autres techniques de biologie moléculaire dans la détection et la caractérisation de l'IBDV	34
CHAPITRE 2 LA MALADIE DE GUMBORO OU BURSITE INFECTIEUSE (IBD).....	36
2.1 Histoire de l'IBD.....	36
2.2 Etiologie	36
2.3 Notions épidémiologiques sur la maladie de Gumboro et l'IBDV	37
2.3.1 Hôtes et sensibilité	37
2.3.2 Sensibilité de l'IBDV aux agents chimiques et physiques.....	37
2.3.3 Voies et modalités de transmission de l'IBDV.....	38
2.3.4 Distribution de l'IBDV	39
2.3.5 Facteurs de risque associés à la maladie de Gumboro	40
2.3.5.1 Echech vaccinal :	40
2.3.5.2 Non-respect des mesures d'hygiène et de désinfection.....	40
2.3.5.3 Non-respect des mesures de barrière sanitaire	40
2.4 Impact économique de la bursite infectieuse	41

2.5 Pathogénie de la maladie de Gumboro.....	41
2.5.1 Vue d'ensemble sur le processus pathogénique de l'IBD	42
2.5.2 Par quel (s) mécanisme (s) l'IBDV provoque des hémorragies ?	43
2.5.3 Immunosuppression induite par l'IBDV	44
2.5.3.1 Effet de l'IBDV sur l'immunité humorale	45
2.5.3.2 Effet de l'IBDV sur l'immunité cellulaire.....	46
2.5.3.3 Effet de l'IBDV sur l'immunité innée.....	46
2.6 Symptômes de la maladie de Gumboro	46
2.6.1 Symptômes observés lors de la forme classique de la maladie de Gumboro.....	47
2.6.2 Symptômes observés lors de la forme immunosuppressive de la maladie de Gumboro.....	47
2.6.3 Symptômes observés lors de la forme aiguë de la maladie de Gumboro.....	48
2.6.4 Résumé comparatif entre les manifestations cliniques des 2 formes aiguë et classique de la maladie de Gumboro	48
2.7 Lésions de la maladie de Gumboro	49
2.7.1 Lésions macroscopiques.....	49
2.7.2 Lésions histologiques.....	49
2.8 Diagnostic de la maladie de Gumboro	51
2.8.1 Diagnostic clinique différentiel.....	51
2.8.2 Diagnostic de laboratoire	52
2.9 Lutte contre la maladie de Gumboro.....	52
2.9.1 Biosécurité et vaccination : les deux piliers de la lutte contre l'IBDV	52
2.9.2 Rappels de quelques notions importantes de vaccinologie aviaire	53
2.9.2.1 Définition d'un vaccin.....	53
2.9.2.2 Différents types de vaccins en aviculture.....	53
2.9.2.2.1 Vaccins vivants (atténués).....	53
2.9.2.2.2 Vaccins inactivés	54
2.9.2.2.3 Vaccins recombinants.....	54
2.9.2.2.4 Vaccins à base d'acides nucléiques (surtout à ADN)	54
2.9.2.2.5 Comparaison entre vaccins vivants et vaccins inactivés.....	54
2.9.2.3 Aperçu sur les protocoles de vaccination préconisés par les autorités vétérinaires pour le poulet de chair et la poulette future pondeuse.....	56
2.9.2.4 Echec vaccinal dans les élevages avicoles	56
2.9.2.4.1 Définition	56
2.9.2.4.2 Facteurs responsables de l'échec vaccinal en aviculture.....	56
2.9.3 Vaccination contre la maladie de Gumboro	58
2.9.3.1 Vaccins Gumboro à virus vivant	58
2.9.3.2 Vaccins Gumboro à virus inactivé.....	59
2.9.3.3 Choix du type de vaccin.....	59
2.9.3.4 Choix de la date de vaccination contre la maladie de Gumboro	60
2.9.3.4.1 Concept de la protection continue.....	60
2.9.3.4.2 Détermination de la date optimale de vaccination contre l'IBD	62
2.9.3.5 Résumé et synthèse des avantages et contraintes des différentes approches vaccinales contre la maladie de Gumboro	66
2.9.3.6 Echec vaccinal contre la maladie de Gumboro	69
2.9.3.7 Listes de différents types de vaccins Gumboro disponibles sur le marché.	70
CHAPITRE 3 PARTIE EXPERIMENTALE : CARACTERISATION MOLECULAIRE ET ETUDE DE L'EFFET HISTOPATHOLOGIQUE DU VIRUS DE LA GUMBORO (IBDV) ISOLE A PARTIR DE QUELQUES ELEVAGES AVICOLES DU CENTRE ET DE L'OUEST DE L'ALGERIE.	71
3.1 Problématique	71
3.2 Objectifs	72
3.3 Choix des élevages et données relatives aux cheptels avicoles étudiés	72
3.4 Méthodes utilisées.....	74
3.4.1 Histopathologie	74
3.4.1.1 Prélèvement d'organes (bourses de Fabricius).....	74

3.4.1.2 Mode opératoire	74
3.4.2 Caractérisation moléculaire.....	74
3.4.2.1 Collecte des échantillons.....	74
3.4.2.2 Extraction de l'ARN viral à partir des cartes FTA®.....	75
3.4.2.2.1 Matériel nécessaire pour l'extraction de l'ARN viral	76
3.4.2.2.2 Étapes du protocole de l'extraction de l'ARN viral.....	76
3.4.2.3 Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR).....	79
3.4.2.3.1 Description générale.....	79
3.4.2.3.2 Mise en œuvre de la RT-PCR.....	79
3.4.2.3.3 Contrôle des produits de RT-PCR par électrophorèse sur gel d'agarose.....	81
3.4.2.4 Séquençage de la région hypervariable du gène VP2	81
3.4.2.4.1 Principe de la méthode de Sanger	81
3.4.2.4.2 Déroulement du séquençage	83
3.4.2.5 Séquence et analyse phylogénétique.....	84
3.5 Résultats	86
3.5.1 Signes cliniques.....	86
3.5.2 Lésions nécropsiques et histopathologiques	86
3.5.3 Caractérisation moléculaire.....	89
3.5.3.1 RT-PCR.....	89
3.5.3.2 Alignement nucléotidique	89
3.5.3.3 Analyse des séquences d'acides aminés déduites des séquences nucléotidiques.....	92
3.5.3.4 Pourcentage de l'identité nucléotidique	94
3.5.3.5 Analyse phylogénétique	96
3.6 Discussion	98
CONCLUSION, RECOMMANDATIONS ET PERSPECTIVES.....	105
APPENDICES	107
APPENDICE A LISTE DES ABBREVIATIONS.	107
APPENDICE B PROTOCOLE DE VACCINATION POUR POULET DE CHAIR PRECONISE PAR LA DSV (Décembre 2016)	109
APPENDICE C PROTOCOLE DE VACCINATION POUR POULETTE DEMARREE PRECONISE PAR LA DSV (Version 1 : avec vaccin Gumboro vectorisé à J1). (Décembre 2016)	110
APPENDICE D PROTOCOLE DE VACCINATION POUR POULETTE DEMARREE PRECONISE PAR LA DSV (Version 1 : avec vaccin Newcastle vectorisé à J1). (Décembre 2016)	111
APPENDICE E LISTES DES DIFFERENTS TYPES DE VACCINS GUMBORO DISPONIBLES SUR LE MARCHE (listes non exhaustives et non actualisées).....	112
APPENDICE F DETAILS DE L'ETAPE "REACTION DE SEQUENCE"	114
APPENDICE G DETAILS DE L'ETAPE "PURIFICATION DE LA REACTION DE SEQUENCE"	116
APPENDICE H DETERMINATION DE LA SEQUENCE DES AMPLIMERES.	117
APPENDICE I ARTICLE SCIENTIFIQUE PUBLIE DANS « Journal of Animal and Plant Science »	118
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	136

LISTE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1.1 Représentation schématique de la structure de l'IBDV (SIB, 2018).	21
Figure 1.2 Représentation schématique du génome de l'IBDV (d'après King et al., 2012).	21
Figure 1.3 Schéma représentatif de la structure de l'IBDV. Les flèches (à droite) indiquent les deux régions hydrophiles majeures situées à l'extrémité la plus externe du domaine P (PBC et PHI) qui sont cruciales pour la neutralisation du virus (d'après Rage et al., 2020).....	22
Figure 1.4 Schéma illustrant le principe de la technique RT-PCR pour la détection de l'IBDV (d'après Ramahefarisoa, 2011).	34
Figure 2.1 Distribution géographique des variants antigéniques et pathotypiques du virus de la maladie de Gumboro selon Jackwood, 2013, avec quelques modifications (in Boudaoud et al., 2016).	39
Figure 2.2 Mécanisme par lequel le virus vvIBDV induit des lésions tissulaires sur les organes cibles de l'organisme hôte (d'après Tanimura, 2022).	43
Figure 2.3 Aspects pathogéniques et immunosuppresseurs de l'IBDV (d'après Sharma et al., 2000)	45
Figure 2.4 Concept de la protection continue. A gauche : cas de Gumboro avec forme hypervirulente. A droite : cas de Gumboro avec forme classique ou subclinique.....	61
Figure 3.1 Carte de localisation des élevages étudiés.	72
Figure 3.2 A gauche : carte FTA® vue de l'extérieur. A droite : collecte d'échantillon sur 3 zones d'une carte FTA® à partir de bourses de Fabricius (FB) issues de 3 foyers à suspicion d'IBD.	75
Figure 3.3 A gauche : trois disques découpés par un "puncher" stérile sur une zone d'une carte FTA® contenant l'empreinte physique de bourses de Fabricius. A droite : les 3 disques découpés placés dans des tubes Eppendorf de 1,5 ml en vue d'en extraire l'ARN.	75
Figure 3.4 Etapes d'extraction de l'ARN viral par adsorption sur membrane de silice (schéma emprunté à Boudaoud, (2015) ; avec étape N°1 adaptée au contexte expérimental de la présente étude).....	78
Figure 3.5 Principe de la méthode de Sanger (Boudaoud, 2015).....	82
Figure 3.6 Lésions macroscopiques chez des oiseaux suspectés de maladie de Gumboro (IBD). (A) : Hémorragies musculaires (cuisse). (B) : Bourse de Fabricius enflée et œdémateuse.....	87
Figure 3.7 (A) : BF normale avec des cortex externes densément peuplés de lymphocytes et des médullaires peu peuplées. Lobules subdivisés par du tissu conjonctif. Surface luminale recouverte d'un épithélium prismatique pseudostratifié (H&E, 20x). (B) : BF normale, identique avec celle à gauche (H&E, 100x).	87
Figure 3.8 (A) : Pâleur marquée due à une déplétion extensive des lymphocytes. Structure, architecture et épithélium normaux (H&E, 20x). (B) : Déplétion extensive des lymphocytes de la bourse de Fabricius (flèches). Œdème interstitiel et afflux d'hétérophiles et de macrophages (H&E, 100x).	87
Figure 3.9 (A) : Déplétion lymphocytaire folliculaire dans la bourse de Fabricius. Infiltration interstitielle extensive d'hétérophiles (H&E, 100x). (B) : Lymphocytes apoptotiques et dégénérés. Infiltration de macrophages et d'hétérophiles. Œdème interstitiel (H&E, 200x).	88
Figure 3.10 (A) : Déplétion lymphocytaire étendue avec foyers nécrotiques à coloration intense dans la bourse de Fabricius. Œdème interstitiel et hyperplasie marqués. L'épithélium est réactif et hyperplasique (H&E, 100x). (B) : Foyer nécrotique constitué de macrophages et de débris cellulaires. Cellules inflammatoires interstitielles (H&E, 200x).	88

- Figure 3.11** Pâleur marquée, déplétion lymphocytaire et œdème dans la bourse de Fabricius (BF). Épithélium réactif et extensivement hyperplasique. **(A)** : H&E, 20x ; **(B)** : H&E, 100x..... 88
- Figure 3.12** Alignement multiple des séquences nucléotidiques (selon la numérotation de Bayliss et al., 1990), permettant de comparer les souches de l'étude (en rouge) avec les souches classiques (en noir), les souches vaccinales (en violet), les souches hypervirulentes (en bleu), les souches variantes (en vert) ainsi que le virus apathogène OH (en orange). 91
- Figure 3.13** Alignement des séquences d'acides aminés déduites de la région hypervariable VP2 des souches d'IBDV, aux positions 211-350. Les points indiquent les positions avec des acides aminés identiques à la souche de référence Faragher 52-70. Les pics hydrophiles majeurs sont encadrés en rouge et les pics hydrophiles mineurs sont encadrés en bleu. Les positions des acides aminés sont conformes à celles de Bayliss et al. (1990). Les positions 222 (A), 256 (I), 294 (I), et 299 (S) des acides aminés sont caractéristiques des vvIBDV. L'heptapeptide 'SWSASGS', une zone riche en sérine (encadrée en jaune), est indicative des souches virulentes d'IBD..... 93
- Figure 3.14** Arbre phylogénétique basé sur le séquençage partiel du gène VP2, montrant la relation entre les deux souches algériennes isolées dans la présente étude et d'autres souches de référence de l'IBDV, d'Algérie et de diverses autres parties du monde (souches de référence classiques, atténuées/vaccinales, vv et variantes de l'IBDV). 96

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2.1 Caractéristiques générales des vaccins vivants et inactivés pour volailles (Marangon et Busani, 2006).	55
Tableau 2.2 Résumé des propriétés immunogéniques et pathogéniques de différents types de souches vaccinales de la maladie de Gumboro (GARDIN, 2000).	60
Tableau 2.3 Correspondance entre l'âge au prélèvement et la correction à rajouter (De Wit, 2001).	65
 Tableau 3.1 Historique des foyers d'IBD de la présente étude	 73
Tableau 3.2 Souches de référence de l'IBDV utilisées en comparaison avec les souches de la présente étude.....	84
Tableau 3.3 Lésions macroscopiques et histopathologiques	86
Tableau 3.4 Comparaison entre les caractéristiques des résidus d'acides aminés des souches de la présente étude avec celles des souches de référence du virus de l'IBD.....	94
Tableau 3.5 Pourcentage d'identité nucléotidique entre les souches de la présente étude et certaines souches de référence du virus de la bursite infectieuse (IBDV).	94

INTRODUCTION

En Algérie, l'industrie avicole joue un rôle significatif dans le secteur agricole. Selon les données de la FAOSTAT [1], le pays a produit 257 000 tonnes de viande de volaille et 305 000 tonnes d'œufs en 2021. Cette activité est d'une grande importance pour la population car elle constitue une source de protéines relativement accessible, tout en offrant aussi un revenu financier pour les aviculteurs. Malgré ces faits, la contribution de la production avicole à la nutrition humaine et à l'économie du pays reste limitée par divers facteurs tels que les coûts de production élevés, le manque de pratiques d'élevage appropriées et les maladies infectieuses.

La bursite infectieuse est une maladie immunosuppressive des jeunes poulets, à prévalence mondiale [2]. Cette pathologie, également appelée "maladie de Gumboro" en référence au lieu où ont survenu les premières épidémies, situé à Delaware, aux États-Unis, a été plus tard désignée sous le nom de "Infectious Bursal Disease" (IBD) ou bursite infectieuse, en raison de variations morphologiques et histologiques observées au niveau de la bourse de Fabricius [3].

L'IBD cause d'importantes pertes économiques directes et indirectes à l'industrie avicole et aux éleveurs du monde entier [4] [5]. L'agent causal de l'IBD est un virus non enveloppé à ARN bicaténaire et bisegmenté (dsRNA) faisant partie de la famille des Birnaviridae et du genre Avibirnavirus [6] [7].

Deux sérotypes de l'IBDV (Sérotypes 1 et sérotype 2) ainsi que plusieurs sous-types antigéniques des virus du sérotype 1 ont été identifiés à l'aide d'essais de neutralisation croisée (VN) [8]. Les souches du sérotype 1 sont pathogènes pour les poulets et varient en virulence, tandis que les souches du sérotype 2, isolées chez les dindes, sont non pathogènes pour les dindes et les poulets [9]. Le sérotype 1 a été classé en différents groupes (pathotypes) en fonction de la variation antigénique, de la virulence et des caractéristiques moléculaires de la région hypervariable (HVR) de VP2. Ces pathotypes comprennent l'IBDV atténué, l'IBDV classique, l'IBDV variant et l'IBDV très virulent (vvIBDV) [10] [11] [12].

Les quatre pathotypes de l'IBDV ont une distribution mondiale et sont présents dans la plupart des pays où l'élevage avicole est pratiqué à grande échelle industrielle. Les souches du pathotype classique (ou souches classiques) de l'IBDV peuvent causer des dommages à la bourse de Fabricius et une nécrose lymphoïde, entraînant un taux de mortalité de 1 à 30[7] [13].

Par ailleurs, les souches IBDV du pathotype variant (ou souches variantes) se caractérisent par une dérive antigénique, causée par des mutations ponctuelles affectant les épitopes neutralisants de VP2 [14] [15].

Ces souches ont été identifiées pour la première fois en Amérique du Nord, où elles ont provoqué une déplétion des lymphocytes B sans induire de réponse inflammatoire ou de signes cliniques de la maladie [10].

Au milieu des années 1980, les souches du pathotype hautement virulent de l'IBDV (ou souches hypervirulentes, vvIBDV en anglais) sont apparues en Europe et ont provoqué des épidémies dévastatrices, entraînant un taux de mortalité de 50 à 100% chez les jeunes poulets [16] [17]. Ces souches se sont ensuite propagées au Moyen-Orient, en Asie, en Amérique du Sud et en Afrique [18] [19].

L'approche principale pour prévenir l'IBD est une combinaison d'immunisation et de mesures de biosécurité [20] [21]. Cependant, malgré la vaccination, les aviculteurs sont toujours confrontés à cette pathologie, car des échecs de vaccination ont été rapportés dans de nombreux endroits à travers le monde [20]. Ces échecs ont été attribués à divers facteurs, notamment l'inadéquation entre la souche vaccinale et la souche de l'IBDV circulant dans les exploitations ("souche sauvage") [22] [23].

En Algérie, l'IBD a été observé pour la première fois dans la production avicole à la fin des années 1980 [24]. En 2000, le séquençage partiel du gène VP2 de sept isolats d'IBDV a fait suspecter la présence d'IBDV hypervirulent[25]. Après quelques années, le tableau clinique de l'IBD dans différentes régions du pays a évolué, avec des taux de mortalité nettement plus élevés par rapport à la forme classique. Ceci a conduit à l'hypothèse que des souches hypervirulentes ont pu se propager à la suite de mutations génétiques au sein du génome de ce virus.

Dans ce contexte, des études ont été effectuées et ont pu confirmer cette hypothèse, faisant état de la présence de souches hypervirulentes (vvIBDV) dans nos élevages avicoles [26] [27].

Par conséquent, une large gamme de vaccins contre la Gumboro a été utilisée dans les différents élevages du pays. Cependant, les pertes dues à cette maladie n'ont pu diminuer, probablement en raison de la persistance de la circulation du vvIBDV, connaissant que cette souche virale est impliquée dans un nombre élevé de cas d'échecs de vaccination, comme signalé dans diverses régions à travers les cinq Continents [28] [21].

Cette étude avait pour but de vérifier la persistance du pathotype hypervirulent de l'IBDV (vvIBDV) dans quelques régions de l'Algérie à travers une caractérisation moléculaire des souches circulantes. Elle visait également à établir la relation entre les virus identifiés et les souches de référence d'IBDV en Algérie et ailleurs dans le monde. Par ailleurs, un examen histopathologique a été réalisé sur la bourse de Fabricius des oiseaux étudiés pour analyser l'impact de ces souches virales sur cet organe.

Dans ce manuscrit :

Nous commencerons par une synthèse bibliographique, divisée en deux chapitres :

Le premier chapitre examinera en détail le virus de la maladie de Gumboro (IBDV), et cela en passant en revue sa classification, sa morphologie, son génome, ses protéines virales mais surtout en abordant son évolution moléculaire à travers le temps et l'espace par le biais de mécanismes très subtils, sans omettre de mettre la lumière sur les méthodes d'identification et de caractérisation de ce redoutable agent étiologique.

Le deuxième chapitre abordera les divers aspects de la maladie de Gumboro, en commençant par son historique, puis son épidémiologie qui inclue ses hôtes, sa transmission et ses facteurs de risque, puis sa pathogénie et les différentes formes cliniques sous lesquelles elle se manifeste, ensuite les lésions nécropsiques et histopathologiques qui la caractérisent, pour finir avec le diagnostic et les méthodes de lutte, en insistant sur la vaccination contre la bursite infectieuse, incluant les types de vaccins, les différentes stratégies vaccinales et surtout les échecs vaccinaux de plus en plus fréquents dans nos élevages avicoles.

Nous poursuivrons avec la partie expérimentale, traitée dans le troisième chapitre, où seront exposés la problématique de cette étude, ses objectifs, le matériel et les méthodes utilisés, ainsi que les résultats obtenus, accompagnés de leur interprétation et discussion.

Enfin, le document se terminera par une conclusion, suivie de recommandations et perspectives.

CHAPITRE 1

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE SUR LE VIRUS DE LA MALADIE DE GUMBORO (IBDV)

1-1 Définition

La bursite infectieuse, une maladie immunosuppressive des jeunes poulets répandue à l'échelle mondiale [2], est également connue sous le nom de "maladie de Gumboro," en référence à la ville du Delaware, aux États-Unis, où les premières épidémies ont été signalées. Plus tard, cette maladie a été renommée "Infectious Bursal Disease" (IBD) ou bursite infectieuse, en raison des altérations morphologiques et histologiques observées dans la bourse de Fabricius [3].

L'IBD entraîne des pertes économiques majeures, tant directes qu'indirectes, pour l'industrie avicole et les éleveurs à travers le monde [4] [5].

1-2 Classification

Le virus de la maladie de Gumboro, unique représentant du genre Avibirnavirus, appartenant à la famille des Birnaviridae, est un virus non enveloppé à ARN double brin et bisegmenté (dsRNA), [6] [7].

Les Birnaviridae est une famille de virus dont les membres possèdent des génomes constitués d'un ARN double brin bisegmenté (dsRNA), d'où le préfixe "bi" [29] [30]. La famille des Birnaviridae est composée de quatre genres : Aquabirnavirus, agents viraux à ARN double brin infectant les poissons, mollusques et crustacés ; Blosnavirus, dont l'espèce type est le virus de la tache de tête de serpent ; Avibirnavirus, dont l'IBDV (virus de la Gumboro) est l'unique espèce représentante ; et Entomobirnavirus, qui comprend des virus infectant les insectes [31].

1-3 Morphologie de l'IBDV

L'IBDV est un virus non enveloppé à ARN bicaténaire et bisegmenté, entouré d'une capsidie icosaédrique simple, mesurant 70 nm de diamètre. Cette dernière est formée d'une

seule coque composée de 260 trimères de VP2 (780 copies) et de VP3 (600 copies), organisés en un réseau icosaédrique. Peu de copies de l'ARN polymérase dépendante de l'ARN VP1 sont présentes à l'intérieur du virion [32]. (Figure 1.1).

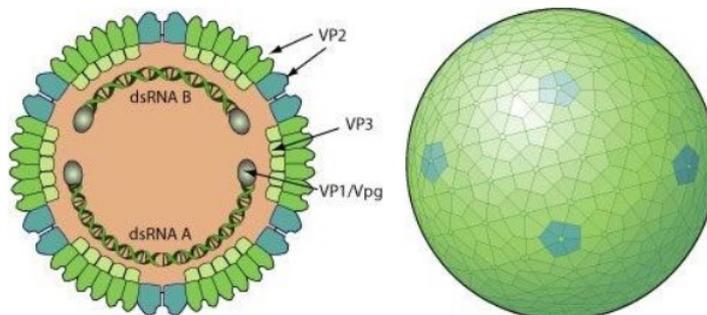


Figure 1.1 Représentation schématique de la structure de l'IBDV (Silveira, 2019) [33].

1-4 Génome de l'IBDV

Le génome de l'IBDV est composé de deux segments A et B. Le segment A comprend une grande trame de lecture ouverte 1 (ORF1), qui code pour une polyprotéine de 110 kDa se clivant en trois protéines virales (VP2, VP3 et VP4) par le biais de mécanismes autocatalytiques, selon Mató et al.^[34]. Les protéines VP2 et VP3 sont des protéines structurelles, tandis que VP4 agit en tant que protéase, comme l'ont rapporté Morgan et al. [35] et Biđin et al. [36]. De plus, un petit gène ORF1 présent dans le segment A code pour VP5, qui est une protéine non structurale, comme l'a souligné Mundt et al.[37]. En revanche, le segment B contient un seul gène ORF qui code pour VP1, qui est l'ARN polymérase du virus [38] [16] [39] (Figure 1.2).

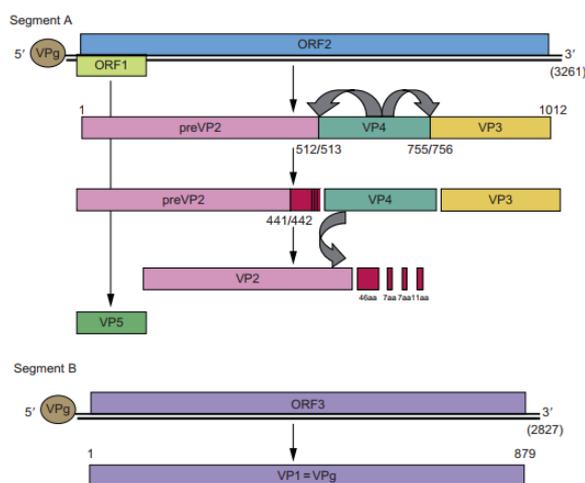


Figure 1.2 Représentation schématique du génome de l'IBDV (d'après King et al., 2012) [40].

1-5 Protéines virales

La protéine **VP1** est considérée comme l'ARN-polymérase du virus. Elle est en effet, de petite taille, présente en faible quantité dans le virion [41].

VP1 existe dans la capside à la fois sous forme de protéine liée de manière covalente aux extrémités 5' du génome bisegmenté, appelée VPg (Viral genome-linked protein) ainsi que sous forme de polypeptide libre [42] [43]. Elle est responsable de la réplication de l'ARN viral après l'infection cellulaire et de la synthèse de l'ARNm [44].

VP2 est la principale protéine de la capside. Elle constitue le déterminant le plus important de l'immunogénicité en déclenchant la réponse en anticorps neutralisants de l'hôte ; elle représente la base moléculaire de la variation antigénique [14].

De plus, elle joue un rôle crucial dans la pathogénicité, la virulence et le tropisme du virus, comme l'ont noté Cheggag et al. [45].

La région hypervariable VP2, s'étendant des acides aminés 206 à 350, contient deux domaines hydrophiles majeurs appelés pics hydrophiles A (acides aminés 212-224) et B (acides aminés 314-325), qui forment respectivement les boucles en épingle à cheveux PBC (acides aminés 219-224) et PHI (acides aminés 316-324) [46] [47] [48] [49] (Figure 1.3). Les pics hydrophiles mineurs 1 (aa 248-254) et 2 (aa 279-290) de VP2 forment respectivement les boucles PDE (aa 249-254) et PFG (aa 279-284) [50].

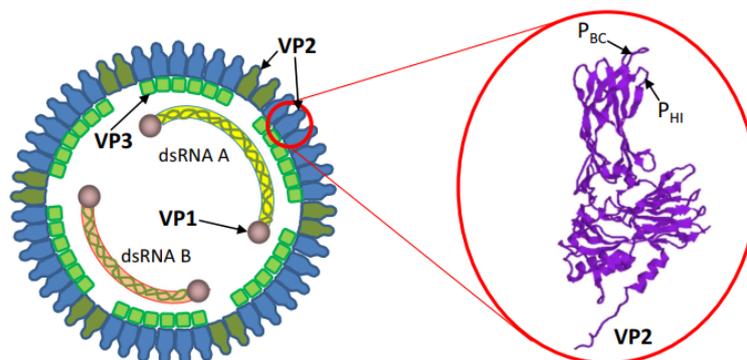


Figure 1.3 Schéma représentatif de la structure de l'IBDV. Les flèches (à droite) indiquent les deux régions hydrophiles majeures situées à l'extrémité la plus externe du domaine P (PBC et PHI) qui sont cruciales pour la neutralisation du virus (d'après Rage et al., 2020) [51]

VP3 est la protéine de la capsid interne et la deuxième protéine structurale majeure (après VP2). Elle représente 40% des protéines virales [32] [52]. Elle contient à la fois des épitopes spécifiques de groupe, (communs aux deux sérotypes), et des épitopes spécifiques de sérotype [53] qui induisent des anticorps non neutralisants et non protecteurs [54] [55]. La protéine VP3 interagit avec VP1, VP2 et avec l'ARN double brin génomique et joue un rôle central dans l'encapsidation et la morphogénèse du virus de la Gumboro [56] [57] [58].

VP4 est une protéase virale (et non une protéine structurale) qui effectue des clivages pour contrôler la reproduction de l'IBDV à plusieurs niveaux [59]. Elle représente 6% des protéines de l'IBDV et joue un rôle majeur dans la maturation de la protéine de capsid VP2, en procédant au clivage de la polyprotéine virale VP0 (pVP2-VP4-VP3) [60]. Sanchez et Rodriguez [61] ont identifié deux sites de clivage, 511LAA513 pour le clivage entre pVP2 (précurseur de VP2) et VP4 et 754MAA756 pour le clivage entre VP4 et VP3.

VP5 est désignée sous le nom de protéine non structurale (pNS) car sa participation dans la structure virale n'a pu être démontrée [26]. Elle est supposée jouer un rôle dans la sortie virale, ainsi que posséder une fonction anti-apoptotique aux premiers stades de l'infection par l'IBDV [62] [63]. Selon Ganguly et Rastogi^[64], VP5 bloquerait l'apoptose au début d'infection pour favoriser la dissémination du virus par lyse cellulaire (car l'apoptose est une mort cellulaire programmée, donc avec un minimum de préjudice pour la cellule et son environnement) puis cette même VP5 favoriserait l'apoptose à la dernière phase d'infection.

1.6 Sérotypes de l'IBDV

Deux sérotypes de l'IBDV peuvent être différenciés par un test de neutralisation virale [9]. Le sérotype 1 comprend les souches pathogènes, tandis que les souches du sérotype 2, principalement isolées chez les dindes, se sont révélées non pathogènes chez les poulets [9]. Les souches d'IBDV diffèrent par leur pathogénicité et peuvent être classées en souches vaccinales légères, intermédiaires et intermédiaires plus ; en souches classiques, variantes ou très virulentes [16].

Les souches variantes antigéniques ont été principalement signalées aux États-Unis [65], en Amérique centrale [66] et en Australie [67]. Les souches classiques de l'IBDV ont été prédominantes pendant plusieurs décennies en Europe [68]. La forme très virulente de

l'IBDV a été identifiée pour la première fois en Belgique au début des années 1980 [69]. Le séquençage des nucléotides de la région variable du VP2 des souches vvIBDV, apparues simultanément dans d'autres pays européens, en Afrique et en Asie, a confirmé qu'elles appartiennent au même groupe [70] [71] [72] et qu'elles sont antigéniquement et génétiquement similaires entre elles [73].

1.7 Evolution moléculaire et épidémiologique du virus de la Gumboro

Nous abordons ici l'évolution épidémiologique de la maladie de Gumboro (ou bursite infectieuse), causée par l'évolution moléculaire de son agent étiologique (l'IBDV), en Europe et aux États-Unis, en mettant en lumière les conséquences des mutations et des réassortiments génétiques sur l'efficacité des vaccins et la présentation clinique de la maladie.

L'évolution des virus IBDV par des mutations ponctuelles (changements mineurs dans l'ARN du virus) ou par des réassortiments génétiques (échange de segments d'ARN entre différents virus) a conduit à une nouvelle situation épidémiologique dans les années 1980, différente entre l'Europe et les États-Unis.

1.7.1 Situation aux États-Unis

Aux États-Unis, cette nouvelle situation s'est caractérisée par une augmentation des échecs de vaccination. Ces échecs étaient dus à une **dérive antigénique**. La dérive antigénique désigne l'accumulation de mutations dans les gènes codant pour les protéines de surface du virus, entraînant des changements dans les antigènes (les parties du virus reconnues par le système immunitaire).

En conséquence, les nouveaux variants du virus avaient une identité antigénique différente de celle des virus standards du sérotype 1, rendant les vaccins existants moins efficaces.

Ces variants antigéniques ont été signalés non seulement aux États-Unis, mais aussi en Australie [67], en Amérique centrale et en Amérique du Sud [74].

En Europe, bien que des virus sauvages avec une antigénicité atypique aient été identifiés, ils n'ont pas remplacé les **variants pathotypiques** qui sont restés dominants [75] [76]. Les variants pathotypiques sont des formes du virus qui provoquent une maladie plus sévère.

Les variants antigéniques, qui sont absents dans la plupart des pays d'Europe et d'Afrique, n'ont pas conduit à une augmentation du taux de mortalité. Cependant, contrairement aux virus classiques, ces variants antigéniques induisent une atrophie rapide de la bourse de Fabricius (BF), un organe important pour le système immunitaire des poulets, avec une faible réaction inflammatoire et une absence de symptômes cliniques évidents [77].

En raison des caractéristiques des variants antigéniques, la forme subclinique de la maladie de Gumboro est devenue prédominante dans les élevages de poulets aux États-Unis. La forme subclinique signifie que les poulets infectés ne montrent pas de symptômes cliniques évidents, rendant la détection de la maladie plus difficile. Cependant, la maladie continue d'affecter le système immunitaire des poulets, ce qui peut avoir des conséquences à long terme sur leur santé et leur productivité.

A noter que le variant MD a été isolé pour la 1ère fois aux USA par Saif en 1984. Plus tard, 4 autres variants antigéniques (A, D, G et E), formant une population distincte désignée sous le nom de Delaware, ont été isolés par Rosenbeger et Cloude^[78].

En résumé, l'évolution des virus de la maladie de Gumboro, notamment aux États-Unis, a conduit à l'émergence de variants antigéniques qui échappent en partie à l'immunité induite par les vaccins standards. Cela a favorisé une forme subclinique de la maladie, caractérisée par des dommages au système immunitaire des poulets sans signes cliniques évidents. En Europe, bien que des virus atypiques aient été détectés, les variants pathotypiques restent prédominants.

1.7.2 Situation en Europe

En Europe, les virus responsables des échecs de vaccination sont des **variants pathotypiques**, c'est-à-dire des versions du virus qui sont plus virulentes mais qui restent antigéniquement proches des virus classiques du sérotype 1 [79]. Cela signifie que, même s'ils sont plus agressifs, ces virus sont suffisamment similaires aux souches classiques pour que les vaccins existants puissent encore partiellement les cibler.

Ces échecs de vaccination ne sont donc pas dus à une dérive antigénique majeure, mais plutôt à la virulence accrue des variants pathotypiques.

Une étude de Owoade et al. [80] suggère que les virus hypervirulents (vvIBDV) présents en Europe pourraient provenir de l'Afrique de l'Ouest. Cette hypothèse est basée sur le haut degré de diversité génétique observé parmi les vvIBDV au Nigéria, ce qui pourrait indiquer une origine africaine de ces souches.

Depuis leur émergence en Europe au milieu des années 1980, ces virus hypervirulents se sont propagés dans d'autres régions du monde, notamment au Japon, dans plusieurs pays asiatiques, africains, et certains pays d'Amérique latine [81].

1.7.3 Distribution mondiale des vvIBDV

Les virus hypervirulents de l'IBDV sont désormais présents à l'échelle mondiale, posant un défi majeur pour le contrôle de la maladie de Gumboro dans l'industrie avicole.

Cependant, certains pays comme le Canada, l'Australie, et la Nouvelle-Zélande ont réussi à rester longtemps indemnes de ces souches hypervirulentes [82] [83] [67].

En résumé, les échecs de vaccination en Europe sont principalement dus à des variants pathotypiques, qui sont plus virulents mais antigéniquement similaires aux souches classiques. L'origine des vvIBDV en Europe pourrait remonter à l'Afrique de l'Ouest, et ces virus se sont depuis propagés mondialement, bien que certains pays soient encore indemnes. L'origine exacte des vvIBDV reste incertaine, soulevant des questions sur leur évolution ou leur préexistence dans la nature.

1.7.4 Mécanismes par lesquels le virus de la Gumboro évolue

Lors de la réplication virale, des erreurs de transcription peuvent survenir, entraînant des mutations. En raison de l'absence de mécanismes efficaces de correction des erreurs pendant la transcription, les virus à ARN génèrent un taux de mutation plus élevé que les virus à ADN [84]. Cela entraîne l'apparition de nombreux mutants au cours du cycle infectieux, bien que leur survie et transmission ne soient pas toujours réussies [85].

Cependant, si ces virus mutants survivent, ils peuvent pérenniser et se transmettre surtout s'ils subissent une sélection positive favorisée -entre autres facteurs- par la pression vaccinale [82]. Cette dernière est observée en cas de réponse immunitaire insuffisante suite

par exemple à l'utilisation extensive de vaccins inactivés contre la Gumboro présentant un répertoire limité d'épitopes neutralisants [85].

Le génome segmenté de l'IBDV, tout comme celui du virus de la grippe, permet théoriquement le réassortiment génétique entre des souches virales apparentées lors de co-infections [86] [87]. Cela peut se produire, par exemple, chez les poulets qui reçoivent un vaccin IBD vivant alors qu'ils sont déjà porteurs d'un virus sauvage [85].

1.8 Identification et caractérisation du virus de la Gumboro

Plusieurs techniques peuvent aider à confirmer l'identité du virus de la maladie de Gumboro en détectant l'antigène ou le génome viral :

1.8.1 Techniques sérologiques pour détecter l'antigène viral de l'IBD

Les méthodes de détection sérologique, y compris le test ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), l'immunodiffusion sur gélose (IDG) le test de précipitation en gel d'agar (AGP) et le test de neutralisation virale (NV), étaient souvent utilisées pour le diagnostic de confirmation de l'IBDV [88] [89].

1.8.1.1 Immunodiffusion sur gélose (IDG)

L'immunodiffusion sur gélose est une technique immunologique utilisée pour détecter la présence d'antigènes ou d'anticorps dans un échantillon en exploitant leur capacité à diffuser dans un milieu gélosé. Voici comment cela fonctionne :

1.8.1.1.1 Principe

1. Préparation du milieu gélosé : Un milieu gélosé est coulé dans une plaque de Petri. Une fois le gel solidifié, des puits sont creusés dans le gel. Un ou plusieurs de ces puits sont remplis avec un échantillon contenant l'antigène (comme un extrait de tissu infecté par l'IBDV), tandis que d'autres puits contiennent un antiserum spécifique (anticorps dirigés contre l'IBDV).

2. Diffusion : Les antigènes et les anticorps diffusent à partir des puits dans la gélose. Lorsque l'antigène et l'anticorps se rencontrent dans le gel, ils forment un complexe antigène-anticorps insoluble qui précipite.

3. Observation de la précipitation : La formation d'une ligne de précipitation visible dans le gel entre les puits indique une réaction positive, signifiant que l'antigène (dans ce cas, le virus de la Gumboro) est présent dans l'échantillon et a réagi avec l'anticorps spécifique.

1.8.1.1.2 Application dans le diagnostic de la maladie de Gumboro (IBDV)

Dans le contexte de la maladie de Gumboro, l'immunodiffusion sur gélose est utilisée pour détecter les antigènes spécifiques du virus de l'IBDV dans des échantillons de tissus, comme la bourse de Fabricius des oiseaux infectés. Voici comment elle est appliquée :

-Diagnostic de confirmation : Lorsqu'on suspecte une infection par l'IBDV, des fragments de tissu bursal infecté sont prélevés et testés par immunodiffusion sur gélose. Le tissu infecté est soumis à des cycles de congélation et de décongélation pour libérer les antigènes viraux, qui sont ensuite placés dans un des puits. Un antisérum spécifique de l'IBDV est ajouté dans un autre puits. Si le virus est présent, une ligne de précipitation se forme dans la gélose, confirmant la présence du virus.

- Avantages et limites : Cette technique est simple et peu coûteuse, ce qui en fait un outil utile pour le diagnostic de terrain. Cependant, elle a des limites, comme une sensibilité relativement faible par rapport à d'autres méthodes sérologiques comme l'ELISA ou le test de neutralisation virale (VN) [90] [91]. Elle ne permet pas non plus de différencier les souches ou les variants du virus [89,92]. Cette technique qui présentait l'inconvénient de ne pas offrir des résultats quantitatifs (mesure du taux d'anticorps) à une certaine époque ne l'est plus actuellement, mais le développement de techniques quantitatives plus sensibles et plus simples comme l'ELISA a rendu cette alternative non praticable [93].

1.8.1.2 Séroneutralisation

Le test de neutralisation virale (VN), ou séroneutralisation, est une méthode utilisée pour mesurer la capacité des anticorps présents dans un sérum à neutraliser un virus. Voici une explication du principe et de l'application de ce test, en particulier pour le virus de la maladie de Gumboro (IBDV) :

1.8.1.2.1 Principe du Test de Neutralisation Virale (VN)

1. Préparation du Sérum et du Virus

- **Sérum** : Le sérum contenant les anticorps (provenant d'animaux ou d'humains) est prélevé et préparé pour le test.
- **Virus** : Une quantité définie de virus est préparée pour être testée.

2. Incubation du Sérum avec le Virus

Le sérum est mélangé avec le virus dans un tube ou un puits de culture. L'idée est que si le sérum contient des anticorps spécifiques contre le virus, ces anticorps se lieront au virus et le neutraliseront.

3. Application sur des Cellules Cibles

Après incubation, le mélange sérum-virus est ajouté à des cellules en culture. Ces cellules sont sensibles au virus et permettent d'observer si le virus est capable d'infecter les cellules.

4. Observation des Effets

- **Neutralisation** : Si les anticorps présents dans le sérum neutralisent le virus, il n'y aura pas de dommages ou d'infection visible des cellules. Cela se manifeste par l'absence de cytopathie (dégâts cellulaires) dans la culture.
- **Non-neutralisation** : Si le sérum ne contient pas suffisamment d'anticorps ou si les anticorps ne sont pas efficaces, le virus infectera les cellules et provoquera des dommages, visibles comme des effets cytopathiques.

5. Détermination du Titre de Neutralisation

Le titre de neutralisation (titre VN) est déterminé en mesurant la plus grande dilution du sérum qui empêche les effets cytopathiques causés par le virus. Cela indique la concentration d'anticorps neutralisants présents dans le sérum.

1.8.1.2.2 Application dans le Cas du Virus de la Gumboro (IBDV)

- Avantages du test de neutralisation virale

Le test de neutralisation virale (VN) est un outil de détection des anticorps plus sensible que l'IGD et peut être utilisé pour la quantification des anticorps ainsi que pour la différenciation des sérotypes 1 et 2 et sous-types (souches) de l'IBDV [94] [95] [92] [96]. La capacité du sérum à neutraliser un virus de référence est déterminée, et un titre de neutralisation (titre VN) est exprimé comme le réciproque de la dilution la plus élevée du sérum qui empêche les effets cytopathiques [92] [89]. Les tests VN sont souvent utilisés pour l'identification de l'IBDV dans les embryons et les cultures tissulaires après son adaptation à ces systèmes hôtes et pour l'évaluation des changements antigéniques et immunogènes [67] [97] [92]. Les tests VN servent à comparer les souches virales en évaluant la capacité d'un antiserum produit contre une souche d'IBDV à neutraliser une souche hétérologue [92].

- Limites de cette méthode

Seules les souches d'IBDV qui se répliquent efficacement dans les embryons ou en culture cellulaire peuvent être utilisées dans le test de neutralisation virale (VN) [92]. Les tentatives d'adaptation du virus à un hôte peuvent entraîner des changements antigéniques et pathologiques du virus, ce qui peut rendre les résultats du VN suspects. Enfin, cette technique est plus laborieuse et plus coûteuse que l'IDG [96].

En résumé, le test de neutralisation virale (VN) est une méthode essentielle pour évaluer la capacité des anticorps à neutraliser le virus de la maladie de Gumboro, permettant non seulement de confirmer la présence du virus, mais aussi de mesurer l'efficacité des réponses immunitaires et des vaccins contre ce virus.

1.8.1.3 Test ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) indirect

L'identification de l'IBDV par la méthode ELISA indirecte repose sur l'interaction entre l'antigène viral et un anticorps de capture, cette réaction étant ensuite mise en évidence par un anticorps de détection. Pour une détection simple du virus, un sérum polyclonal est utilisé comme anticorps de capture, tandis que des anticorps monoclonaux sont employés pour une caractérisation plus détaillée du virus.

1.8.1.3.1 Principe du Test ELISA indirect

1. Préparation de la plaque : Une plaque de microtitration est sensibilisée, c'est-à-dire recouverte d'antigènes d'IBDV. Ces antigènes sont fixés au fond des puits de la plaque.

2. Ajout de l'échantillon : L'échantillon à tester, qui peut contenir des anticorps spécifiques à l'IBDV, est ajouté dans les puits. Si des anticorps anti-IBDV sont présents dans l'échantillon, ils vont se lier aux antigènes fixés sur la plaque.

3. Ajout de l'anticorps secondaire : Un anticorps secondaire, qui est un anticorps de chèvre ou de lapin dirigé contre les anticorps de poulet (dans ce cas, les anticorps primaires anti-IBDV), est ajouté. Cet anticorps secondaire est conjugué à une enzyme, la peroxydase, qui permet de visualiser la réaction.

4. Révélation de la réaction : Un substrat contenant du peroxyde est ajouté. Si la peroxydase est activée (ce qui signifie que l'anticorps secondaire s'est lié à l'anticorps primaire), elle catalyse la dégradation du peroxyde, entraînant un changement de couleur dans le puits. La plaque doit être mise à l'obscurité pendant cette étape afin d'éviter toute dégradation prématurée du substrat sensible à la lumière.

5. Mesure de la densité optique (DO): La couleur produite est quantifiée en mesurant la densité optique (DO) à l'aide d'un spectrophotomètre.

6. Conversion de la DO en titre d'anticorps : La DO mesurée est convertie en un titre d'anticorps grâce à un logiciel associé au lecteur de plaque. Ce titre permet d'estimer la quantité d'anticorps anti-IBDV présents dans l'échantillon testé. Plus la DO est élevée, plus la concentration d'anticorps anti-IBDV dans l'échantillon est importante.

1.8.1.3.2 Application dans le Cas du Virus de la Gumboro (IBDV)

De nombreux kits ELISA commerciaux détectent les anticorps contre les deux sérotypes et varient considérablement en termes de sensibilité et de spécificité [98] [99] [92] [89]. Le système ELISA de capture d'anticorps (Ac-ELISA), utilisant des anticorps monoclonaux (MAbs), a été développé pour caractériser les propriétés antigéniques et les relations entre les souches d'IBDV [100] [101] [102]. Couramment utilisée pour mesurer les titres d'anticorps sériques contre l'IBDV, cette méthode sensible et rapide permet de différencier

les souches classiques, variantes et vvIBDV [101] [103] [73]. Ces titres sont utiles pour évaluer le niveau d'immunité d'un cheptel lors d'une épidémie, ainsi que l'efficacité d'un programme de vaccination [89]. Par ailleurs, les anticorps polyclonaux associés aux tests Ac-ELISA sont plus susceptibles d'être utilisés pour le dépistage général de l'IBDV [104].

En résumé, L'ELISA est la méthode la plus rapide et la plus sensible, avec les moins de variations dues à la souche virale utilisée comme antigène. Elle est économique, simple, rapide, et permet de tester un grand nombre d'échantillons en même temps et est adaptable à l'automatisation et aux logiciels informatiques [105].

Par ailleurs, les inconvénients de l'utilisation de tels tests ELISA résident dans la préparation extensive des MAbs, la culture de l'IBDV dans des fibroblastes d'embryons de poulet (CEF) ou dans des bourses de Fabricius de poulet, ainsi que dans le fait que les résultats ne correspondent pas toujours aux résultats des tests VN [92].

1.8.2 Techniques moléculaires (pour détecter le génome de l'IBDV)

Nous aborderons ici la méthode de RT-PCR (Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction) pour l'identification du virus de la maladie de Gumboro (IBDV). Nous traiterons que de ses généralités. Les détails de cette technique seront traités dans "Matériel et Méthodes" du chapitre 3.

1.8.2.1 But de la technique

La RT-PCR est utilisée pour détecter et amplifier l'ARN du virus de l'IBDV, ce qui en fait une méthode de référence pour le diagnostic de cette maladie [106].

1.8.2.2 Etapes de la RT-PCR

1.8.2.2.1 Transcription inverse (RT)

L'ARN du virus est d'abord converti en ADN complémentaire (ADNc) grâce à une enzyme appelée transcriptase inverse. Cette étape est nécessaire car la PCR, par nature, amplifie l'ADN, pas l'ARN.

1.8.2.2 Amplification en chaine (PCR)

1. Dénaturation : Une fois l'ADN complémentaire (ADNc) obtenu, la PCR commence. La première étape est la dénaturation, où l'ADN double brin est chauffé pour séparer les deux brins, rendant les brins d'ADN accessibles pour les amorces.

2. Hybridation : Les amorces, qui sont de courtes séquences d'ADN conçues pour se lier spécifiquement à des régions complémentaires de l'ADN cible, se fixent sur ces brins d'ADN lors de la phase d'hybridation. Cette étape se déroule à une température plus basse que la dénaturation.

3. Élongation : Une enzyme appelée polymérase ajoute des nucléotides à partir des amorces pour synthétiser de nouveaux brins d'ADN, prolongeant ainsi les brins d'ADN existants. Cette étape se déroule à une température spécifique qui favorise l'activité de la polymérase.

Les étapes de dénaturation, hybridation, et élongation sont répétées sur plusieurs cycles (jusqu'à 30-40), amplifiant ainsi la quantité d'ADN cible à chaque cycle. Plus il y a de cycles, plus il y a d'ADN produit, ce qui permet une détection même à partir de faibles quantités initiales d'ARN viral.

Cette technique est particulièrement intéressante pour le diagnostic de l'IBD (maladie de Gumboro) car elle permet de détecter spécifiquement le génome viral de l'IBDV, offrant une grande sensibilité et spécificité.

La figure 1.4 ci-dessous illustre le principe de cette méthode :

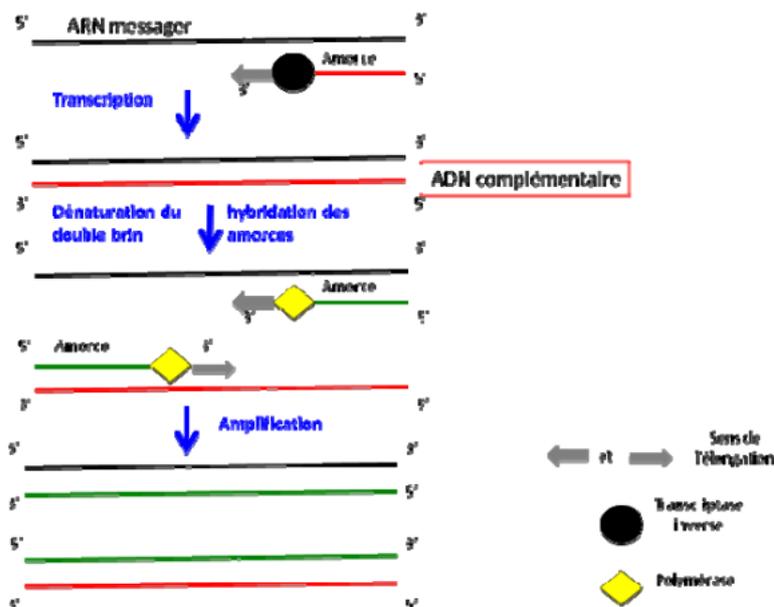


Figure 1.4 Schéma illustrant le principe de la technique RT-PCR pour la détection de l'IBDV (d'après Ramahefarisoa, 2011) [106].

1.8.3 Quelques données bibliographiques sur l'intérêt de la RT-PCR et d'autres techniques de biologie moléculaire dans la détection et la caractérisation de l'IBDV

La transcription inverse conventionnelle (RT) suivie de la réaction en chaîne par polymérase (PCR) est couramment utilisée pour la détection des sérotypes de l'IBDV, et moins régulièrement, pour différencier les souches d'IBDV [107] [108]. Le besoin de méthodes plus rapides pour caractériser la région variable de VP2 dans différents souches d'IBDV a conduit à des développements dans les techniques de diagnostic moléculaire basées sur la technologie RT-PCR [92].

Les approches initiales impliquaient l'utilisation d'enzymes de restriction (ER) (par exemple, BstNI, MboI, et SspI) pour l'analyse du polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP) des produits RT-PCR [109] [108] [72]. Conçues pour détecter des motifs de bandes uniques associés à la variation antigénique dans la région codant pour VP2, ces méthodes étaient utiles pour classer les souches d'IBDV en groupes moléculaires [108] [92]. Cependant, ces techniques se sont révélées plus tard peu fiables en raison de corrélations inconsistantes entre les motifs RFLP des produits RT-PCR et les sous-types antigéniques de l'IBDV [92].

Les développements de la technique RT-PCR incluent l'utilisation de la RT-PCR multiplex ou de la RT-PCR quantitative en temps réel, ainsi que le séquençage de l'ADN des produits de RT-PCR [110] [111] [112] [92]. Les méthodes de RT-PCR quantitative en temps réel permettent une détection rapide, sensible et précise des souches d'IBDV (classique, variante et très virulent) à l'aide d'amorces spécifiques à chaque souche, et fournissent également une mesure quantitative de la charge virale dans les échantillons de test provenant des troupeaux de volailles [110] [113] [92].

Le séquençage des nucléotides et des acides aminés de toute la région codant pour la protéine VP2 de nombreux isolats de terrain de l'IBDV est fréquemment utilisé pour les comparer avec des souches antérieures et pour des analyses phylogénétiques [114] [115] [116]. Ces analyses comparatives sont très utiles pour identifier des acides aminés potentiels dans la région variable centrale, responsables des variations moléculaires et phénotypiques parmi les souches d'IBDV [115] [76] [117].

Les souches IBDV variantes et les souches hypervirulentes (vvIBDV) présentent des substitutions distinctes de nucléotides et d'acides aminés par rapport aux souches classiques, qui peuvent être rapidement détectées par séquençage de l'ADN des produits RT-PCR [92]. Par exemple, il a été rapporté que les résidus aux positions A222, I242, Q253, I256, D279, A284, I294 et S299 sont considérés comme caractéristiques des vvIBDV [118] [119] [120].

Par ailleurs, les acides aminés qui affectent de manière significative l'antigénicité se trouvent à la position 222 et dans la région du pic hydrophile B, entre les acides aminés 314 et 324 [75] [121]. De plus, la région du pic hydrophile B est impliquée dans la formation des épitopes neutralisants [122] [115].

Un heptapeptide riche en sérine, S-W-S-A-S-G-S (résidus 326 à 332), adjacent au domaine hydrophile B (acides aminés 314-325), est conservé dans diverses souches virulentes de l'IBD, comme l'ont noté des études antérieures menées par Brown et al. [79], Hernández et al. [123], Felice et al. [124] et Alkhalefa et al. [125]. Les souches faiblement pathogènes et adaptées à la culture cellulaire contiennent moins de résidus de sérine dans cet heptapeptide [122] [126] [127].

CHAPITRE 2

LA MALADIE DE GUMBORO OU BURSITE INFECTIEUSE (IBD)

2.1 Histoire de l'IBD

En 1962, Cosgrove a rapporté une maladie spécifique, la maladie de la bourse infectieuse (IBD), qui affecte la bourse de Fabricius chez les poulets. Les premiers cas ont été observés dans la région de Gumboro, aux États-Unis, d'où est dérivé le nom, même si les termes "IBD" ou "bursite infectieuse" sont des descriptions plus précises. Entre 1960 et 1964, la maladie a été observée dans la plupart des régions des États-Unis et est devenue une maladie dévastatrice en Europe entre 1962 et 1971. Avec sa propagation pandémique entre 1966 et 1974, la maladie a été signalée en Afrique du Sud et de l'Ouest, en Extrême-Orient, au Moyen-Orient, en Inde et en Australie [128].

Une enquête menée par l'OIE en 1995 a révélé que 95 % des 65 pays concernés par cette étude ont annoncé la présence de l'infection, y compris la Nouvelle-Zélande, qui était exempte de la maladie jusqu'en 1993 [129].

2.2 Étiologie

La bursite infectieuse, également connue sous le nom de maladie de Gumboro, est une maladie virale aiguë et hautement contagieuse, touchant principalement les jeunes poules, causée par un virus non enveloppé à ARN double brin et bisegmenté, appartenant à la famille des Birnaviridae [130][131]. Deux sérotypes distincts du virus de la maladie infectieuse de la bourse (IBDV), à savoir les sérotypes 1 et 2, ont été rapportés [130], parmi lesquels seul le sérotype 1 a été associé à des maladies cliniques, ce qui signifie que tous les vaccins commerciaux disponibles ont été préparés contre le sérotype 1 [129].

Le sérotype 1 est pathogène uniquement pour les poulets et peut être subdivisé en fonction des aspects antigéniques/génétiques (classique et variant) et du niveau de pathogénicité (atténué, virulent vIBDV et très virulent vvIBDV) [132]^[12]. Cependant, les taux de mortalité varient au sein des souches d'IBDV du sérotype 1, allant d'aucune mortalité pour

les souches variantes, environ 20 % pour les souches classiques [7] et plus de 50 % pour le vvIBDV [7] [133].

Les virus du sérotype 2 sont naturellement avirulents et ne provoquent pas de maladie clinique chez les poulets et les dindes [134].

Plus de détails sur le virus de l'IBD sont présentés dans le chapitre 1.

2.3 Notions épidémiologiques sur la maladie de Gumboro et l'IBDV

2.3.1 Hôtes et sensibilité

Bien que les dindes, les canards, les pintades, les faisans et les autruches puissent être infectés, la maladie clinique survient uniquement chez les poulets (espèce *Gallus gallus*). La forme clinique touche les sujets surtout âgés entre 3 et 6 semaines [96].

Une forme subclinique est courante chez les sujets âgés de 1 jour à 3 semaines [135].

Il a été constaté que les races légères présentent une mortalité plus élevée que les races plus lourdes [136] [137]. Toutefois, une étude plus ancienne affirme qu'il n'y a aucune différence de mortalité entre les races lourdes et légères dans une enquête portant sur 700 foyers de la maladie [138], évidemment ceci concerne la souche virale classique.

Par ailleurs, certains auteurs ont trouvé que les volailles de type ponte sont plus susceptibles au vvIBDV que les volailles de type chair [139].

Müller et al., 2003 ont rapporté que les souches vvIBDV provoquent une mortalité de 50 à 60 % chez les pondeuses, de 25 à 30 % chez les poulets de chair et de 90 à 100 % chez les Leghorns SPF sensibles.

2.3.2 Sensibilité de l'IBDV aux agents chimiques et physiques

Le virus est non enveloppé et assez résistant aux agents physiques et chimiques. En raison de sa stabilité et de sa robustesse, il persiste dans les locaux avicoles même après un nettoyage rigoureux et une désinfection minutieuse [96].

Benton et al. [140] ont constaté que l'IBDV résistait au traitement à l'éther et au chloroforme, était inactivé à un pH de 12 mais non affecté par un pH de 2, et restait viable

après 5 heures à 56°C. Le virus n'était pas affecté par une exposition d'une heure à 30°C à 0,5 % de phénol et 0,125 % de thimérosal. Landgraf et al. [141] ont constaté que le virus survivait à 60°C mais non à 70°C pendant 30 minutes, et que 0,5 % de chloramine tuait le virus après 10 minutes.

Par ailleurs, Une réduction marquée de l'infectiosité du virus a été observée après une exposition à 0,5 % de formol pendant 6 heures. Le virus a également été traité avec diverses concentrations de trois désinfectants (un complexe d'iode, un dérivé phénolique et un composé d'ammonium quaternaire) pendant 2 minutes à 23°C. Seul le complexe d'iode a eu des effets néfastes sur le virus [140].

2.3.3 Voies et modalités de transmission de l'IBDV

Les oiseaux infectés excrètent le virus dans leurs déjections pendant au moins 14 jours. Le virus est excrété dans les fèces et contamine ensuite l'eau, les aliments et la litière, où il persiste et se propage couramment [142]. La maladie se transmet par l'eau, les aliments et les déjections contaminés. Le mode de transmission le plus courant est par voie orale chez les poules sensibles, et l'IBDV peut se propager par le biais d'équipements contaminés [143]. Bien que la transmission de la maladie par aérosol soit possible, la voie féco-orale est le principal chemin par lequel les poussins sensibles peuvent être infectés [144].

Il ressort de ce qui précède que le virus se transmet par voie directe (oiseaux infectés contaminent les non infectés par leurs déjections) mais surtout par voie indirecte (aliments, eau et équipements souillés par les fèces de sujets contaminés).

La résistance du virus à la chaleur et aux désinfectants est suffisante pour expliquer la survie du virus dans les bâtiments et l'environnement entre les épidémies. Benton et al. [145] ont constaté que les bâtiments d'où des oiseaux infectés avaient été retirés restaient infectieux pour d'autres oiseaux 54 et 122 jours plus tard. Ils ont également démontré que l'eau, l'alimentation et les déjections provenant d'enclos infectés restaient infectieuses après 52 jours.

Il est important de souligner qu'il n'existe aucune preuve suggérant que l'IBDV se propage par transmission transovarienne. De plus, aucun vecteur ou réservoir spécifique de l'IBDV n'a été établi, bien que le virus ait été isolé chez des moustiques (*Aedes vexans*), des rats et des ténébrions meuniers (*Alphitobius diaperinus*) [146].

2.3.4 Distribution de l'IBDV

L'évolution des virus de la maladie de Gumboro, par mutations ponctuelles, par réassortiments génétiques ou par recombinaisons homologues, a fait émerger des virus variants antigéniques et pathotypiques. Les variants antigéniques ont été décrits pour la première fois aux États Unis d'Amérique (USA) par Saif en 1984 [85]. Depuis, ils ont été signalés au Canada [147], en Australie [67], en Amérique centrale et en Amérique du Sud [74]. Les virus hypervirulents, qui sont des variants pathotypiques, ont été signalés pour la première fois en Europe en 1987 [148]. Ils sont aujourd'hui de distribution mondiale, seules l'Australie et la Nouvelle-Zélande sont restées indemnes (Fig. 2.1) [85].

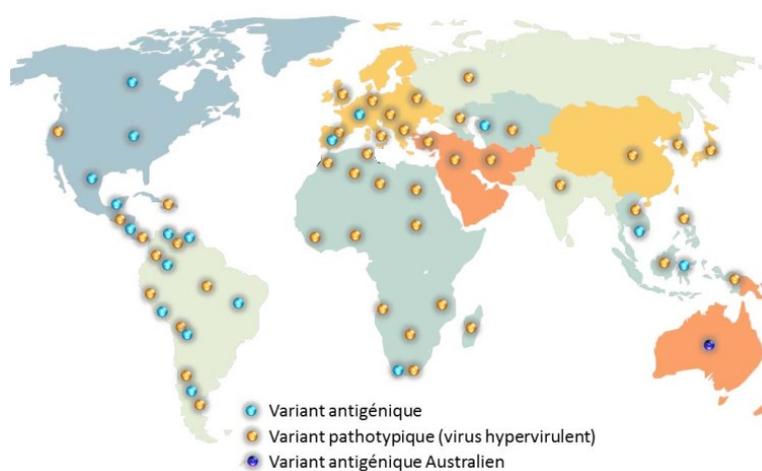


Figure 2.1 Distribution géographique des variants antigéniques et pathotypiques du virus de la maladie de Gumboro selon Jackwood, 2013, avec quelques modifications (in Boudaoud et al., 2016) [85].

2.3.5 Facteurs de risque associés à la maladie de Gumboro

2.3.5.1 Echec vaccinal :

Le premier facteur de risque est l'échec de vaccination contre la maladie de Gumboro. Ce point crucial sera étudié avec plus de détails en abordant le volet lié à la lutte contre cette pathologie redoutable.

2.3.5.2 Non-respect des mesures d'hygiène et de désinfection

Ce facteur d'une importance capitale, lié beaucoup plus à la résistance du virus de la Gumboro, peut être résumé dans les points suivants :

- Désinfection des bâtiments d'élevage non conforme aux normes, soit dans le choix des désinfectants ou dans la méthode elle-même.
- Non-respect de la notion de repos sanitaire, surtout après une épidémie de Gumboro.
- Non-respect des mesures d'hygiène avant l'entrée des travailleurs aux poulaillers ou durant leur travail (oublier de se laver les mains, de porter une combinaison propre, de tremper ses bottes dans le pédiluve désinfecté...).

2.3.5.3 Non-respect des mesures de barrière sanitaire

Ces mesures concernent toutes les pratiques qui visent à limiter l'entrée des micro-organismes dans les bâtiments d'élevage (même celles énoncées plus haut en font partie). Bien que ces actions ne soient pas propres à la bursite infectieuse, elles sont capables -si on s'y conforme- de réduire considérablement le risque associé à l'IBD, et d'autant plus celui lié aux autres pathologies aviaires. Parmi les pratiques du non-respect de ces mesures, on peut citer :

- L'absence d'une clôture autour de l'exploitation avicole ;
- Le mélange de cheptels de différents âges dans le même bâtiment ;
- L'absence de SAS à l'intérieur du bâtiment d'élevage ;
- Le manque d'entretien des autoluves et pédiluves placés respectivement à l'entrée des exploitations avicoles et des poulaillers ;

- L'accès de personnes étrangères à l'intérieur des bâtiments d'élevage sans nécessité de travail et sans prendre les précautions de routine.

Ce dernier point est un facteur de risque majeur, surtout si le visiteur est lui-même un éleveur avicole, comme a été rapporté dans l'étude de Rashid et al. [149].

2.4 Impact économique de la bursite infectieuse

L'impact économique de la maladie de Gumboro (IBD) chez les volailles est grave et influencé par la souche du virus, la susceptibilité et la race du cheptel, les agents pathogènes primaires et secondaires présents, ainsi que les facteurs environnementaux et de gestion. L'IBDV clinique entraîne des pertes directes dues à des mortalités élevées ; en outre, la condamnation des carcasses en raison des hémorragies des muscles squelettiques, des cuisses et des muscles pectoraux peut constituer une cause importante de pertes économiques [150].

Les pertes indirectes dues à la maladie de Gumboro résultent de l'immunosuppression sévère des poules de chair et des pondeuses et de leur prédisposition accrue à d'autres maladies et aux échecs de vaccination. En conséquence, cela entraîne une croissance retardée, un gain de poids réduit, une conversion alimentaire réduite, une mortalité accrue et une qualité inférieure des produits [150].

L'apparition des vvIBDV a aggravé l'impact économique de la maladie. Cette forme aiguë due aux souches hypervirulentes a entraîné des échecs de vaccination, ainsi qu'une mortalité et une morbidité plus élevées. Dans 80 % des pays membres de l'OIE, des cas cliniques aigus dus au vvIBDV ont été rapportés [16].

2.5 Pathogénie de la maladie de Gumboro

La pathogénie peut être définie comme le processus utilisé par l'IBDV pour causer des lésions à l'hôte, entraînant la mortalité, la maladie et/ou l'immunosuppression. Ces lésions peuvent être évaluées à différents niveaux : l'hôte, l'organe et la cellule, et sont exacerbées dans les formes aiguës de la maladie [151].

2.5.1 Vue d'ensemble sur le processus pathogénique de l'IBD

L'organe cible de l'IBDV est la bourse de Fabricius (BF) au moment de son développement maximal, qui est une source spécifique de lymphocytes B matures chez les espèces aviaires. La bursectomie peut prévenir la maladie chez les poussins infectés par un virus virulent [152]. La gravité de la maladie est directement liée au nombre de cellules sensibles présentes dans la BF ; par conséquent, la plus grande sensibilité par rapport à l'âge se situe entre 3 et 6 semaines, lorsque la BF est au maximum de son développement. Cette sensibilité à l'âge est prolongée dans le cas d'une infection par le vvIBDV [69] [153]. La déplétion des cellules B lymphoïdes dans la bourse de Fabricius après l'infection par l'IBDV est due à la fois à la nécrose et à l'apoptose. Les cellules B porteuses d'immunoglobuline M en division active sont lysées par l'infection à l'IBDV [154] [155]. L'apoptose, caractérisée par la fragmentation nucléaire et la dégradation cellulaire en vésicules apoptotiques, joue également un rôle important dans la pathogenèse de l'IBDV. Un niveau élevé d'apoptose peut être observé dans les lymphocytes sanguins périphériques des poulets infectés par l'IBDV de sérotype 1 [156]. Les souches très virulentes provoquant une pathologie accrue et une mortalité plus précoce induisent également un niveau plus élevé d'ARNm de $\text{chIFN-}\gamma$ dans les tissus bursaux [157] [158]. Les protéines virales VP2 et surtout VP5 ont été suspectées de jouer un rôle crucial dans la réplication de l'IBDV en induisant la mort cellulaire [159] [63]. Il a été démontré *in vitro* que l'infection par l'IBDV active certaines voies de signalisation cellulaire (via les caspases et $\text{NF-}\kappa\text{B}$), probablement en augmentant les ROS (Reactive Oxygen Species), ce qui entraîne l'apoptose tardive dans le cycle infectieux [63]. Plus récemment, il a été confirmé que VP5 est un important inducteur de l'apoptose en interagissant avec le canal anionique dépendant du voltage 2 (VDAC2) dans la mitochondrie [160].

Les cellules de la lignée monocyte-macrophage peuvent également être infectées de manière persistante et productive, jouant un rôle crucial dans la dissémination du virus [161] ainsi que dans le déclenchement de la maladie [162]. Dans les macrophages bursaux, l'ARN viral a été détecté par RT-PCR et les protéines virales par immunochimie entre 1 et 7 jours après l'infection [163]. En conséquence, les fonctions des macrophages, notamment l'activité phagocytaire, sont modifiées par l'infection à l'IBDV [164], et l'expression des gènes des cytokines est régulée à la hausse, influençant ainsi la réponse immunitaire normale des oiseaux affectés [164].

Enfin, bien que les cellules T ne soient pas sensibles à l'infection, elles jouent un rôle indirect important dans la pathogenèse de l'IBD. En effet, il y a un afflux et une infiltration de cellules CD4+ et CD8+ dans la BF entre 1 et 10 jours après l'infection, ce qui pourrait probablement aggraver les dommages cellulaires [164].

Tanimura [165] propose ce schéma illustratif (Fig. 2.2) pour résumer le mécanisme par lequel une souche hypervirulente (vvIBDV) pourrait induire des lésions tissulaires sur l'organisme hôte.

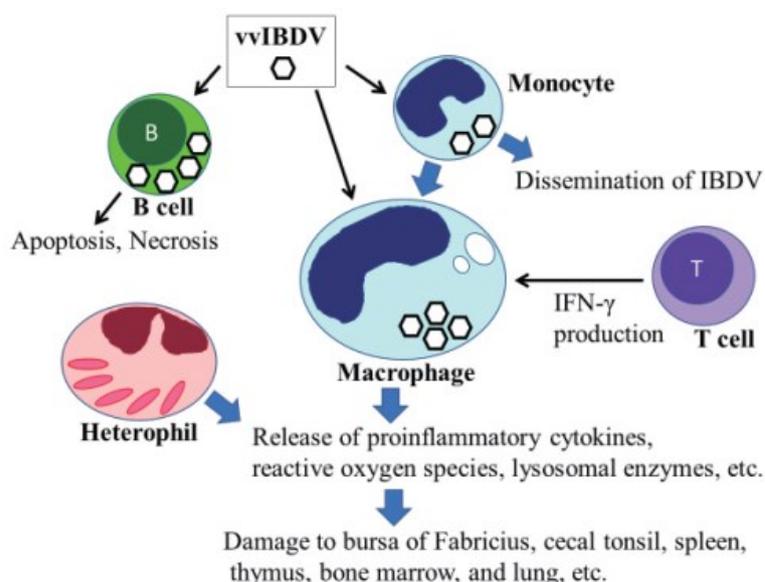


Figure 2.2 Mécanisme par lequel le virus vvIBDV induit des lésions tissulaires sur les organes cibles de l'organisme hôte (d'après Tanimura, 2022) [165].

2.5.2 Par quel (s) mécanisme (s) l'IBDV provoque des hémorragies ?

Plusieurs études sur la pathogenèse des infections par l'IBDV ont été menées. Skeeles et al, [166] ont tenté de démontrer que les lésions hémorragiques étaient le résultat de la formation de complexes immuns, comme proposé par Ivanyi et Morris [167]. Les lésions histologiques dans la bourse cloacale ressemblent à une réaction d'Arthus (nécrose, hémorragie et grand nombre de leucocytes polymorphonucléaires). Cette réaction est un type de lésion immunologique localisée causée par des complexes antigène-anticorps-complément qui induisent des facteurs chimiotactiques, provoquant une hémorragie et une infiltration de leucocytes, notamment les hétérophiles [89].

Kosters et al, [168] et Skeeles et al, [166] ont trouvé des temps de coagulation prolongés chez les poulets infectés par l'IBDV et ont suggéré que de telles coagulopathies contribueraient aux lésions hémorragiques observées lors de cette maladie. Skeeles et al. [169] ont constaté que des poulets de 17 jours n'ont pas présenté de défauts de coagulation, mais qu'à 42 jours, ils avaient des temps de coagulation considérablement augmentés et sont devenus cliniquement malades ; 4 sur 11 en étaient morts.

2.5.3 Immunosuppression induite par l'IBDV

L'infection par l'IBDV entraîne souvent une immunosuppression. Les effets immunosuppresseurs semblent être les plus prononcés si l'exposition au virus survient dans les 2 à 3 premières semaines après l'éclosion [170]. Dans les élevages de poulets commerciaux, l'immunosuppression peut se manifester cliniquement de plusieurs façons. En général, les performances du cheptel sont réduites. Plus précisément, les sujets immunosupprimés ont tendance à présenter une incidence accrue d'infections secondaires, une mauvaise conversion alimentaire, une réponse protectrice réduite aux vaccins couramment utilisés, et un taux accru de condamnation des carcasses à l'abattoir. L'immunosuppression peut accompagner des flambées cliniques ou subcliniques d'IBDV [164].

L'immunosuppression induite par l'IBDV a été bien documentée, bien que les mécanismes ne soient pas entièrement compris. Les réponses immunitaires humorales et cellulaires sont compromises [171] [162]. Les aspects généraux de la pathogenèse et de l'immunosuppression induites par l'IBDV sont décrits dans la Figure 2.3.

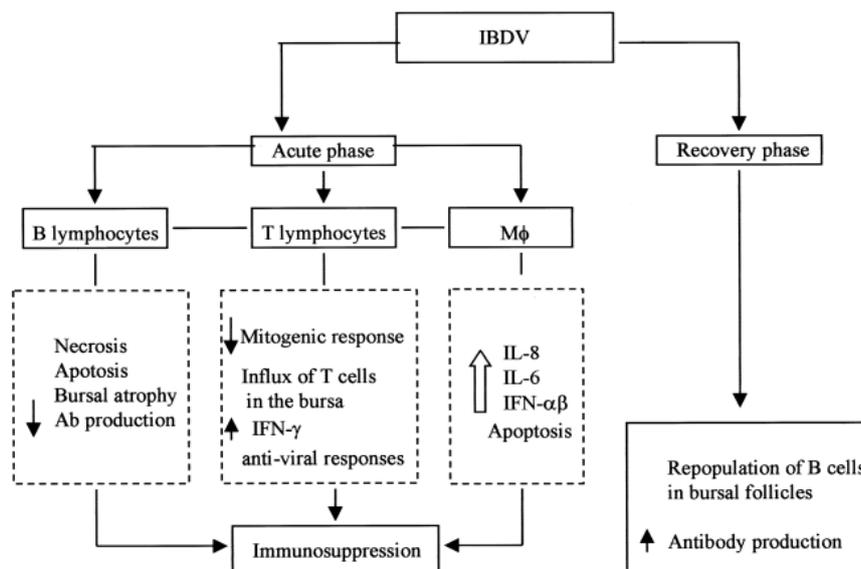


Figure 2.3 Aspects pathogéniques et immunosupresseurs de l'IBDV (Sharma et al., 2000) [164]

2.5.3.1 Effet de l'IBDV sur l'immunité humorale

Comme mentionné ci-dessus, l'IBDV provoque une infection lytique des lymphocytes B IgM⁺. Bien que la destruction des cellules B soit la plus prononcée dans la bourse de Fabricius, des preuves de la réplication virale et de la destruction cellulaire associée peuvent également être trouvées dans plusieurs organes lymphoïdes secondaires, y compris les amygdales cœcales et la rate [155]. L'effet cytolytique de l'IBDV sur les cellules B conduit à une réduction dramatique des lymphocytes B IgM⁺ circulants [155] [172]. Les poulets exposés à l'IBDV produisent des niveaux sous-optimaux d'anticorps contre un certain nombre d'antigènes infectieux et non infectieux [173]. Seules les réponses primaires en anticorps sont altérées ; les réponses secondaires restent intactes [10] [155].

Bien que la destruction des cellules B productrices d'immunoglobulines puisse être l'une des causes principales de la déficience humorale, d'autres mécanismes possibles doivent être examinés. Par exemple, l'effet potentiel de l'IBDV sur les fonctions des cellules présentatrices d'antigènes et des cellules T auxiliaires doit être étudié [164].

Ces derniers auteurs rapportent que la déficience humorale induite par l'IBDV est réversible. Cependant, Il est intéressant de noter que la chronologie de la restauration de la production d'anticorps était associée à la restauration morphologique de l'architecture normale des follicules de la bourse [164].

2.5.3.2 Effet de l'IBDV sur l'immunité cellulaire

En parallèle de la déplétion des lymphocytes B dans la bourse, une infiltration de lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ activés se produit. Bien que les cellules T ne soient pas susceptibles d'être infectées par l'IBDV, la réponse immunitaire cellulaire est également compromise [164]. Des preuves suggèrent que les cellules T peuvent moduler l'immunopathogenèse de l'IBDV en restreignant la réplication de l'IBDV dans la bourse au stade précoce de la maladie. Par leur libération de cytokines et leurs effets cytotoxiques, les cellules T peuvent renforcer la destruction des tissus bursaux, supprimer l'immunité et retarder la récupération des follicules bursaux. En même temps, les cellules T peuvent favoriser l'élimination de l'IBDV [164].

2.5.3.3 Effet de l'IBDV sur l'immunité innée

Les cellules de la lignée monocyte-macrophage peuvent être infectées de manière persistante et productive et jouent un rôle crucial dans la dissémination du virus [174] et dans le déclenchement de la maladie [175]. Une infiltration accrue de macrophages dans la BF peut entraîner une expression plus élevée de cytokines pro-inflammatoires [interleukine (IL)-6, IL-1b et IL-18], ainsi que de la synthèse inductible de l'oxyde nitrique (iNOS), qui joue un rôle essentiel dans la pathogénie de la maladie [163] [176].

En résumé, dans le cas de l'IBDV, l'immunosuppression est une conséquence directe de l'infection de différents types de cellules immunitaires des poules (cellules B, macrophages), suivie de l'induction de la nécrose et de l'apoptose [177] [160] ou une conséquence indirecte des changements induits par le virus dans la régulation des réponses immunitaires [178]. Dans tous les cas, l'issue d'une forme clinique de l'IBD (pour les sujets qui ont survécu) ou d'une infection subclinique serait une immunosuppression avec des conséquences plus graves si la souche est très virulente et si l'infection est survenue à un âge précoce [151].

2.6 Symptômes de la maladie de Gumboro

La voie d'infection par l'IBDV, l'état immunitaire et l'âge des poulets malades [179], ainsi que la nature des virus infectants [180], sont généralement des facteurs importants pour l'apparition des signes cliniques et l'excrétion de l'IBDV. Il est rapporté que la période

d'incubation varie entre 2 et 4 jours [181] et que des signes cliniques sévères sont observés entre 3 et 6 semaines d'âge [89]. Il a été rapporté que les poulets âgés de moins de 2 semaines et de plus de 6 semaines présentent rarement des signes cliniques [181].

Trois formes de la maladie sont les plus courantes sur le terrain: classique, immunosuppressive et aiguë [182].

2.6.1 Symptômes observés lors de la forme classique de la maladie de Gumboro

La forme classique est associée à la présence de cIBDV et survient généralement après une baisse des titres d'anticorps maternels dans les troupeaux vaccinés. Elle est distribuée dans le monde entier, étant endémique dans la plupart des régions. Elle peut être subclinique si l'infection survient entre 0 et 3 semaines (ne pas confondre avec la forme subclinique due à la souche variante) et s'accompagne d'un taux de mortalité situé entre 1 et 30 % [7] [13]. Les signes, lorsqu'une manifestation clinique se produit, incluent le picage des plumes autour du cloaque, des tremblements, des plumes ébouriffées, une diarrhée aqueuse, de l'anorexie, de la dépression, une prostration sévère et la mort. Comme il n'existe pas de signes cliniques caractéristiques de l'infection par l'IBDV, c'est principalement à l'autopsie que l'on peut obtenir des informations plus révélatrices [182] [144].

2.6.2 Symptômes observés lors de la forme immunosuppressive de la maladie de Gumboro

La forme immunosuppressive est liée à l'émergence de souches varIBDV, capables d'échapper aux anticorps neutralisants circulants (Snyder et al. 1992), principalement aux États-Unis, au Canada et en Australie [101] [67] [183] en raison de la prédominance des souches varIBDV dans ces régions. Bien que l'immunocompétence des poulets soit gravement diminuée, cette forme est asymptomatique dans la majorité des cas [182] [144]. Cependant, les pertes économiques associées aux cheptels immunodéficients liés à varIBDV sont considérables [184], principalement en raison de la diminution de l'efficacité des programmes de vaccination et de l'augmentation de la susceptibilité aux agents pathogènes opportunistes [151].

2.6.3 Symptômes observés lors de la forme aiguë de la maladie de Gumboro

Enfin, la forme aiguë est causée par des souches vvIBDV, capables d'infecter en présence d'anticorps maternels et de provoquer des taux de mortalité plus élevés que prévu [16]. Les premiers cas de cette forme de maladie ont été signalés en Europe, mais vvIBDV est actuellement présent dans de nombreuses régions, principalement en Afrique, en Asie et en Amérique du Sud [89]. Les signes cliniques sont ceux de la forme classique, mais ils sont décrits comme ayant une manifestation plus intense et plus généralisée au sein du cheptel affecté. Les taux de mortalité peuvent varier entre 50 et 100 % [16] [89].

2.6.4 Résumé comparatif entre les manifestations cliniques des 2 formes aiguë et classique de la maladie de Gumboro

La période d'incubation est très courte : 2 à 3 jours pour les souches classiques. Dans le cas d'une infection par vvIBDV, la période d'incubation semble être raccourcie (60 heures au lieu de 72), ce qui serait cohérent avec une réplication plus rapide chez les animaux affectés [151].

Par ailleurs, les vvIBDV produisent des signes cliniques similaires aux infections dues aux souches classiques, mais la forme aiguë est exacerbée et plus généralisée dans le troupeau affecté. Dans les deux formes, les animaux sont épuisés, prostrés, déshydratés, souffrent de diarrhée aqueuse et leurs plumes sont ébouriffées. La mortalité commence au troisième jour de l'infection, atteint un pic, puis diminue rapidement, et les poulets survivants retrouvent un état de santé apparent après 5 à 7 jours [151]. Toutefois, comparés aux souches virulentes classiques, les virus IBD hautement virulents induisent des taux de mortalité plus élevés.

Enfin, certains auteurs considèrent que la cause précise de la maladie clinique et de la mort qui s'en suit reste inconnue, car elle n'est pas clairement liée à la gravité des lésions et à l'étendue des dommages dans la bourse de Fabricius. En effet, après l'infection, certains oiseaux présentant peu de lésions de la bourse peuvent être retrouvés morts, tandis que d'autres peuvent survivre malgré des dommages étendus de cet organe. Cette variabilité semble être liée à des facteurs propres à l'hôte [151].

2.7 Lésions de la maladie de Gumboro

2.7.1 Lésions macroscopiques

Bien que l'IBD affecte divers organes lymphoïdes, la cible principale du virus est la bourse de Fabricius, qui est le réservoir des lymphocytes B chez les oiseaux. Les lymphocytes matures et compétents se développent en réponse à la stimulation par le virus, tandis que les lymphocytes immatures sont détruits. Les lésions macroscopiques sont principalement observées dans la BF, qui présente tous les stades de l'inflammation suivant l'infection aiguë [7].

Lors de l'examen post-mortem des oiseaux morts pendant la phase aiguë de vvIBD, la bourse de Fabricius est l'organe diagnostique principal : elle est turgescente, œdémateuse et parfois hémorragique, et devient atrophiée en 7 à 10 jours [89]. Les lésions sont transitoires (pour les sujets qui ont survécu à la maladie) et la structure de la bourse de Fabricius est restaurée et repeuplée de lymphocytes ; la durée du processus de récupération dépend de l'âge au moment de l'infection et de la virulence de la souche [164].

De plus, dans la forme aiguë de la maladie causée par des souches hypervirulentes, des lésions macroscopiques peuvent également être observées dans d'autres organes lymphoïdes (thymus, rate, amygdales caecales, glandes Harderiennes et plaques de Peyer) [89].

Aussi, à l'autopsie, les animaux affectés présentent des reins hypertrophiés et blanchâtres contenant des dépôts de cristaux d'urates et des débris cellulaires, des carcasses sévèrement déshydratées, souvent des muscles pectoraux assombris avec de nombreuses pétéchies. Des masses d'hémorragies dans les cuisses et les muscles pectoraux peuvent être présentes et sont fréquemment observées, probablement en raison d'un trouble de la coagulation. Du mucus peut également être présent dans les intestins. Le foie apparaît pâle, taché de bile, et des foyers gris peuvent également être présents sur une rate hypertrophiée [169].

2.7.2 Lésions histologiques

La BF est le tissu préféré pour évaluer les changements microscopiques. Cependant, concernant cet organe, il n'y a pas de différences marquées entre les lésions induites par vvIBDV et d'autres types d'IBDV. Les lésions deviennent visibles 24 heures après

l'infection et jusqu'au jour 3, elles sont caractérisées par une augmentation de la nécrose folliculaire lymphoïde et une inflammation aiguë. Au jour 3, tous les follicules lymphoïdes sont affectés avec une déplétion des cellules lymphoïdes, accompagnée d'une infiltration des macrophages et d'hétérophiles, un œdème bursal et une hyperémie. La déplétion lymphoïde se poursuit et, à partir du jour 5, des cavités kystiques remplies de débris tissulaires se développent dans les zones médullaires. Chez les poussins infectés par des souches classiques d'IBDV à faible pathogénicité, la régénération de la bourse, visible par la repopulation avec des lymphocytes, commence 8 à 21 jours après l'infection [185].

Dans les BF des poussins infectés par vvIBDV, comme dans celles des poussins infectés par des souches classiques d'IBDV plus virulentes, il n'y a pas de phase de récupération et des lésions chroniques se développent à partir de 3 semaines après l'infection. Ces lésions comprennent des follicules lymphoïdes épars et irrégulièrement repeuplés, séparés par un tissu conjonctif fibroblastique interfolliculaire. L'épithélium bursal a une structure glandulaire proliférative et contenant de la mucine.

Par ailleurs, les souches hypervirulentes, contrairement aux autres types d'IBDV, induisent des lésions microscopiques dans des tissus lymphoïdes non bursaux, tels que le thymus, les amygdales caecales, la rate et la moelle osseuse. La présence de ces lésions a été décrite uniquement dans les infections expérimentales et les lésions n'ont pas été utilisées pour le diagnostic différentiel. Dans le thymus, une atrophie corticale légère est observée entre 2 et 7 jours. Dans les amygdales caecales, la nécrose des cellules lymphoïdes est visible dans tous les centres germinatifs de 2 à 5 jours après l'infection. Dans la rate, il y a beaucoup moins de lymphocytes dans les centres germinatifs et davantage de macrophages et d'hétérophiles. Dans la moelle osseuse, il y a moins de cellules hématopoïétiques de 2 à 7 jours après l'infection [186].

Enfin, il est important de noter que l'identification du type de souche d'IBDV impliquée n'est pas possible sur la base de l'examen microscopique seul [185].

2.8 Diagnostic de la maladie de Gumboro

2.8.1 Diagnostic clinique différentiel

Le diagnostic de l'IBD nécessite une compréhension de l'historique du cheptel, des signes cliniques et des lésions [187]. L'examen macroscopique et histologique de la bourse de Fabricius est d'une grande importance pour le diagnostic de l'IBD chez les jeunes poulets [28].

Les formes cliniques de la maladie de Gumboro (bursite infectieuse) sont facilement reconnaissables, et un diagnostic de suspicion peut être rapidement établi. L'apparition rapide, la forte morbidité, la courbe de mortalité en pic, et la récupération rapide (5 à 7 jours) sont des signes évocateurs de cette pathologie. La confirmation du diagnostic peut être faite lors de l'examen post-mortem en examinant les changements caractéristiques visibles macroscopiquement dans la bourse cloacale. Il est important de se rappeler qu'il y a des modifications distinctes de la taille et de la couleur de la BF au cours de l'infection, c'est-à-dire, une augmentation due aux changements inflammatoires suivie d'une atrophie. En effet, Dans la forme aiguë, la BF est turgescente, œdémateuse, et parfois hémorragique, et devient atrophiée dans les 7 à 10 jours [28]. La BF est atrophiée dans l'IBD subclinique et peut être confondue avec la maladie de Marek ou l'anémie infectieuse [188].

Les infections chez les poussins très jeunes, ou les poussins avec des anticorps maternels, sont généralement subcliniques et sont diagnostiquées rétrospectivement lors de l'examen anatomopathologique par l'observation d'une atrophie bursique macroscopique et microscopique. Les infections chez les poulets de tout âge avec des souches variantes de l'IBDV ne seront détectées que par l'histopathologie de la bourse cloacale ou par l'isolement du virus [89].

L'apparition soudaine, la morbidité, le plumage ébouriffé et l'apparence abattue des oiseaux lors des premières épidémies de la maladie suggèrent une épidémie aiguë de coccidiose. Dans certains cas, la présence de sang dans les fientes peut amener à suspecter une coccidiose. Cependant, les hémorragies musculaires et les bourses de Fabricius hypertrophiées, œdémateuses ou hémorragiques suggèrent plutôt une bursite infectieuse [89].

Les hémorragies musculaires et les hémorragies muqueuses observées à la jonction du proventricule et du gésier sont similaires à celles rapportées pour le syndrome hémorragique et peuvent être différenciées sur la base des changements boursiers qui accompagnent les infections par le virus de la Gumboro (IBDV) [89]. Dans le même contexte, Les maladies telles que la maladie de Newcastle dans certaines formes viscérales, les mycotoxicoses et l'anémie infectieuse sont des diagnostics différentiels avec la bursite infectieuse. Dans tous ces cas, la présence de lésions au niveau de la BF est un élément en faveur de l'IBD [146].

Les oiseaux qui meurent de l'IBD peuvent montrer une néphrose aiguë. En raison de nombreuses autres affections pouvant causer une néphrose et de l'inconstance des lésions rénales, ces lésions à elles seules ne devraient pas être suffisantes pour faire suspecter un épisode de Gumboro. En effet, certaines souches néphropathogènes du virus de la bronchite infectieuse causent une néphrose [189]. Ces cas peuvent être différenciés de la maladie de Gumboro par l'absence de modifications au niveau de la bourse de Fabricius, et les mortalités sont généralement précédées de signes respiratoires [89].

2.8.2 Diagnostic de laboratoire

Le but du diagnostic de laboratoire est de confirmer ou infirmer la suspicion de la maladie de Gumboro faite sur le plan clinique et anatomopathologique. En effet, l'examen des lésions microscopiques peut confirmer un diagnostic d'IBD mais ne peut pas différencier l'IBDV classique du vvIBDV [185].

Plusieurs techniques peuvent aider à révéler l'identité du virus de la maladie de Gumboro en détectant l'antigène ou le génome viral. Ces aspects ont été détaillés dans le chapitre 1 sous le titre : "1.8 Identification et caractérisation du virus de la Gumboro".

2.9 Lutte contre la maladie de Gumboro

2.9.1 Biosécurité et vaccination : les deux piliers de la lutte contre l'IBDV

Éliminer les particules d'IBDV, qui sont robustes et persistantes, du bâtiment d'élevage est une tâche difficile car le virus reste infectieux pendant 122 jours dans un poulailler et pendant 52 jours dans les aliments et l'eau [20]. À cet effet, des mesures sanitaires draconiennes doivent être rigoureusement suivies pour contrôler l'IBDV. La désinfection

peut réduire la charge virale et, par conséquent, le risque de transmission. Les vecteurs mécaniques tels que les moustiques, les vers de farine et les petits rongeurs doivent être éradiqués [188].

Dans les exploitations où des épidémies d'IBDV se sont produites, le virus peut être considéré comme endémique. Un nettoyage et décontamination inadéquats des équipements exposent les jeunes oiseaux au virus dès leur jeune âge. Une infection subclinique précoce peut en résulter et provoquer à son tour des pertes économiques considérables, car cette forme peut provoquer une suppression sévère et prolongée du système immunitaire, et les oiseaux immunodéprimés ne réagiraient pas efficacement à la vaccination et seraient plus susceptibles à d'autres infections. Ainsi, la vaccination reste la méthode de choix pour contrôler l'IBD. Cependant, les échecs de vaccination se produisent en raison de l'évolution du virus, ainsi qu'au choix non étudié de la date de vaccination [188].

2.9.2 Rappels de quelques notions importantes de vaccinologie aviaire

2.9.2.1 Définition d'un vaccin

Préparation douée du pouvoir antigénique destinée à provoquer dans l'organisme auquel on l'administre, la formation d'anticorps à un taux suffisant pour immuniser le sujet contre l'infection spécifique correspondant à l'antigène.

2.9.2.2 Différents types de vaccins en aviculture

2.9.2.2.1 Vaccins vivants (atténués)

Ces vaccins contiennent des virus vivants mais atténués pour leur ôter leur pouvoir pathogène. Ils sont capables de se multiplier dans l'organisme vacciné ; peuvent se transmettre d'une volaille à une autre au sein du même cheptel, ce qui explique leur administration en masse (eau de boisson, nébulisation). Ils induisent une immunité d'installation rapide mais de durée courte.

2.9.2.2.2 Vaccins inactivés

Ces vaccins sont à virus inactivés (tués). Ils ne sont pas capables de se multiplier dans l'organisme vacciné ; ne se transmettent pas par contact, ce qui explique la nécessité de leur administration par mode individuel. Ils induisent une immunité d'installation tardive mais de durée longue.

2.9.2.2.3 Vaccins recombinants

Ces vaccins sont créés en insérant du matériel génétique (comme de l'ADN) du virus cible dans un vecteur, qui est généralement un autre virus. Ce vecteur, non pathogène pour l'hôte, sert de véhicule pour introduire le matériel génétique dans les cellules de l'animal, ce qui induit une réponse immunitaire. L'exemple du vaccin contre la maladie de Marek, qui utilise le virus de l'herpès de dinde (HVT) comme vecteur, est un cas typique de vaccin vectorisé.

Les vaccins aviaires recombinants ont généralement les mêmes caractéristiques que les vaccins aviaires vivants, notamment le pouvoir de se transmettre d'un oiseau à l'autre et d'être administré collectivement [190]. Exception est faite pour les virus recombinants de la maladie de Marek et de la variole aviaire dont les virus porteurs ne peuvent se transmettre d'une volaille à une autre, ce qui justifie leur utilisation individuelle [190].

2.9.2.2.4 Vaccins à base d'acides nucléiques (surtout à ADN)

C'est une approche où seul l'acide nucléique (généralement l'ADN) de l'agent pathogène est injecté à la volaille. A cause de sa voie exclusivement injectable, ce vaccin ne se transmet pas d'un oiseau à un autre [190].

2.9.2.2.5 Comparaison entre vaccins vivants et vaccins inactivés

Le tableau 2.1 résume les caractéristiques des vaccins aviaires vivants et inactivés :

Tableau 2.1 Caractéristiques générales des vaccins vivants et inactivés pour volailles (Marangon et Busani, 2007) [191].

Vaccins vivants	Vaccins inactivés
<ul style="list-style-type: none"> - Contiennent de petites quantités d'antigènes. Le virus vaccinal se multiplie dans l'organisme des oiseaux. - Sont facilement tués par la chaleur et les agents chimiques. - Relativement peu coûteux, d'administration facile, et destinés aux voies collectives : eau de boisson, spray. - Ces vaccins ne nécessitent pas d'adjuvants. - Sont neutralisés s'il y a présence d'anticorps d'origine maternelle. - Pouvoir de booster l'immunité peu efficace chez les oiseaux immunisés. - L'immunité locale est stimulée. - Danger de contamination par le virus vaccinal (ex : EDS). - Possibilité de réaction tissulaire. - Possibilité d'association de vaccins limitée. - Immunité d'installation rapide mais de durée courte. 	<ul style="list-style-type: none"> - Contiennent de grandes quantités d'antigènes. Pas de multiplication virale après l'administration. - Sont stockés aisément. - Coûts de production et d'application élevés. Administration exclusivement individuelle. - Ces vaccins nécessitent l'utilisation d'adjuvants. - La plupart sont capables d'induire une réponse immunitaire même en présence d'anticorps d'origine maternelle. - On peut booster l'immunité même chez les oiseaux immunisés. - L'immunité locale peut être « restimulée » si on vise à la booster mais absence de réaction II aire. - Pas de danger de contamination par le virus vaccinal. - Absence de réplication microbienne, donc pas de réaction tissulaire sauf celle liée à l'adjuvant. - Association de plusieurs vaccins inactivés. - Immunité d'installation tardive mais de durée longue.

2.9.2.3 Aperçu sur les protocoles de vaccination préconisés par les autorités vétérinaires pour le poulet de chair et la poulette future pondeuse

Les dernières recommandations en notre possession émises par la Direction des Services Vétérinaires en Algérie relatives aux protocoles de vaccination pour le poulet de chair et la poulette future pondeuse (p. démarrée) datent de Décembre 2016 (Appendices B, C et D).

2.9.2.4 Echec vaccinal dans les élevages avicoles

2.9.2.4.1 Définition

L'échec vaccinal est l'absence ou l'insuffisance de la réponse immunitaire suite à une vaccination. Ceci se traduit soit par l'apparition clinique de la maladie contre laquelle on a vacciné, soit par une absence ou diminution des anticorps ou cellules dirigés contre l'agent vaccinal (selon qu'il agisse d'une réponse à médiation cellulaire ou humorale).

2.9.2.4.2 Facteurs responsables de l'échec vaccinal en aviculture

Plusieurs facteurs peuvent affecter l'efficacité de la vaccination [191], qui sont liés soit :

1. Au vaccin lui-même ;
2. A la méthode de vaccination ;
3. Aux volailles à vacciner (statuts sanitaire et immunitaire initiaux) ;
4. A la pression virale à l'intérieur du bâtiment d'élevage.

1- Facteurs liés au vaccin lui-même

- **Souche vaccinale** : l'utilisation d'une souche vaccinale qui n'est pas compatible avec la souche du virus sauvage est responsable d'échecs vaccinaux.

- **Rupture de la chaîne de froid** : le non-respect des conditions de stockage des vaccins, généralement comprises entre 2°C et 8°C, peut entraîner une perte du titre vaccinal. En revanche, le vaccin contre la maladie de Marek doit être conservé à -196°C, dans des bonbonnes d'azote liquide.

- **Péremption** : s'assurer toujours que le vaccin n'est pas périmé.

2- Facteurs liés à la méthode de vaccination

- La présence de traces de désinfectants sur le matériel de dépôt ou de passage de la solution vaccinale (ustensiles, canalisations...etc.) inactive le vaccin et conduit à un échec vaccinal.
- L'insuffisance du nombre d'abreuvoirs conduit à une hétérogénéité de la prise vaccinale, d'où l'absence de prise vaccinale pour un nombre d'oiseaux.
- La défaillance des installations d'abreuvement (ex : canalisations colmatées par des dépôts de tartre) conduit à des prises vaccinales irrégulières.
- Une durée de prise vaccinale trop courte ou trop longue conduit à un échec vaccinal dû soit à une irrégularité de la prise vaccinale dans le premier cas ou à une perte du titre vaccinal dans le second cas.

3- Facteurs liés aux volailles à vacciner

- **Statut sanitaire des volailles** : vacciner des sujets malades rend la vaccination peu efficace. Pire, il se pourrait qu'il y ait aggravation si on vaccine en présence de maladies immunodépressives (surtout avec l'utilisation des vaccins vivants).

- **Présence d'anticorps d'origine maternelle** : la persistance d'anticorps d'origine maternelle peut interférer avec certaines vaccinations et conduire à des échecs vaccinaux par neutralisation du virus vaccinal.

4- Facteurs liés à la pression virale à l'intérieur du bâtiment d'élevage

Une pression virale trop élevée à l'intérieur du bâtiment d'élevage due à une désinfection insuffisante peut rendre la vaccination inefficace, surtout si le vaccin destiné au cheptel du poulailler est d'une virulence faible ou moyenne.

Tous ces facteurs, soit réunis, ou intervenant séparément, sont susceptibles d'induire un échec vaccinal [191].

2.9.3 Vaccination contre la maladie de Gumboro

Les vaccins contre l'IBD sont préparés seulement avec des souches du sérotype 1. Le virus du sérotype 2 n'a pas été décrit comme associé à une maladie, mais sa présence induira des anticorps. Les anticorps induits par le sérotype 2 ne confèrent aucune protection contre l'infection par les virus du sérotype 1 [129].

2.9.3.1 Vaccins Gumboro à virus vivant

Les vaccins vivants de l'IBD sont produits à partir de souches virales totalement ou partiellement atténuées et qualifiées de « douces », « d'intermédiaires » ou « d'intermédiaires plus » (également dites « chaudes ») [129].

Certaines références font la distinction entre les souches dites « intermédiaires plus » et celles dites « chaudes », ces dernières étant considérées moins atténuées que les premières.

Les vaccins « doux » et les vaccins « intermédiaires » sont utilisés chez les reproducteurs pour induire une réponse primaire avant qu'une vaccination de rappel soit réalisée juste avant l'entrée en ponte à l'aide d'un vaccin à virus inactivé. Les vaccins « doux » et les vaccins « intermédiaires » sont sensibles à la neutralisation par les anticorps d'origine maternelle. Par conséquent, ils ne devraient être administrés qu'une fois que ces anticorps ont disparu [129].

Les vaccins « intermédiaires » et les vaccins « intermédiaires plus » sont utilisés pour les poulets de chair et les poulettes futures pondeuses (démarrées). Ils sont également administrés aux jeunes futurs reproducteurs s'il y a un risque élevé d'infection par l'IBDV [129].

Bien que les vaccins « intermédiaires » soient sensibles à la présence d'anticorps d'origine maternelle, ils sont parfois administrés à l'âge de 01 jour, par nébulisation, pour protéger les sujets du cheptel qui pourraient être dépourvus d'anticorps d'origine maternelle ou n'en avoir que des quantités minimales [129].

2.9.3.2 Vaccins Gumboro à virus inactivé

Les vaccins à IBDV inactivé sont principalement utilisés pour induire des taux d'anticorps élevés, durables et homogènes chez les poules reproductrices qui ont été précédemment primo-immunisées durant la période d'élevage, soit par l'administration d'un vaccin vivant, soit par une exposition naturelle à un virus sauvage [129].

Le niveau précis et la durée de l'immunité conférée par les vaccins à virus inactivé dépendront principalement de la concentration antigénique présente dans chaque dose.

Les anticorps circulants dans le sang de la poule traversent l'oviducte pour gagner le vitellus. Ils sont libérés dans le sang du poussin au fur et à mesure que le sac vitellin de celui-ci est résorbé, et cela dans le but de protéger le poussin issu de ces parentales durant ses deux à trois semaines d'âge [23].

2.9.3.3 Choix du type de vaccin

Les vaccins vivants atténués contre la maladie de Gumboro doivent offrir un équilibre entre immunogénicité et pathogénicité résiduelle [129].

Concernant l'immunogénicité, il est important de signaler que dans les conditions du terrain, les vaccins contre la Bursite Infectieuse ne sont pas utilisés sur des poussins SPF (specific pathogen free) mais sur des animaux porteurs d'anticorps d'origine maternelle (AOM) par rapport auxquels le pouvoir de franchise de la barrière de ces immunoglobulines varie d'un vaccin à un autre. Les plus virulents (moins atténués) seront efficaces même en présence d'anticorps d'origine maternelle alors que les plus atténués nécessitent un taux d'anticorps faible ou nul pour entraîner une séroconversion [23].

Par ailleurs, plus le virus vaccinal (ou sauvage) est virulent plus les dommages sur la bourse de Fabricius sont significatifs d'où l'importance aussi de cette notion de pathogénicité. Par conséquent, l'équilibre entre immunogénicité et pathogénicité doit être recherché pour obtenir une protection.

Le tableau 2.2 résume les propriétés immunogéniques et pathogéniques de différents types de souches vaccinales de la maladie de Gumboro.

Tableau 2.2 Résumé des propriétés immunogéniques et pathogéniques de différents types de souches vaccinales de la maladie de Gumboro (Bentaleb, 2006) [192].

Type de souche	Immunogénicité		Pathogénicité		Diffusibilité	
	Poussins SPF	Poussins Avec AOM	Sur des poussins SPF			Poussins avec AOM
			< 10 jours	> 10 jours		
Légère (douce) (ex : Cevac BURSAL).	+++	–	–	–	–	–
Intermédiaire (ex : Cevac Gumbo L, S 706, D 78...).	+++	+	+	–	–	+/-
Intermédiaire Plus (ex : Cevac IBDL, S228 E...)	+++	+++	+++	+	–	++
Chaude (ex : MOULTHROP...).	+++	+++	++++	+++	++	+++

2.9.3.4 Choix de la date de vaccination contre la maladie de Gumboro

2.9.3.4.1 Concept de la protection continue

Les anticorps d'origine maternelle (AOM) vont conférer une protection d'une durée moyenne de quatorze à vingt jours chez le poulet de chair (et de vingt et un à vingt-huit jours chez la poulette future pondeuse ou reproductrice) [192]. Prendra ensuite le relais l'immunité active. C'est ici que surgit la problématique de la date de vaccination : si on vaccine en présence des anticorps d'origine maternelle, le vaccin sera neutralisé ; si l'on décide d'administrer ce dernier tardivement, on tombera dans la phase critique où on risque une infection par le virus sauvage, car sur le terrain, il y a compétition entre le virus sauvage et le virus vaccinal (fig. 2.4).

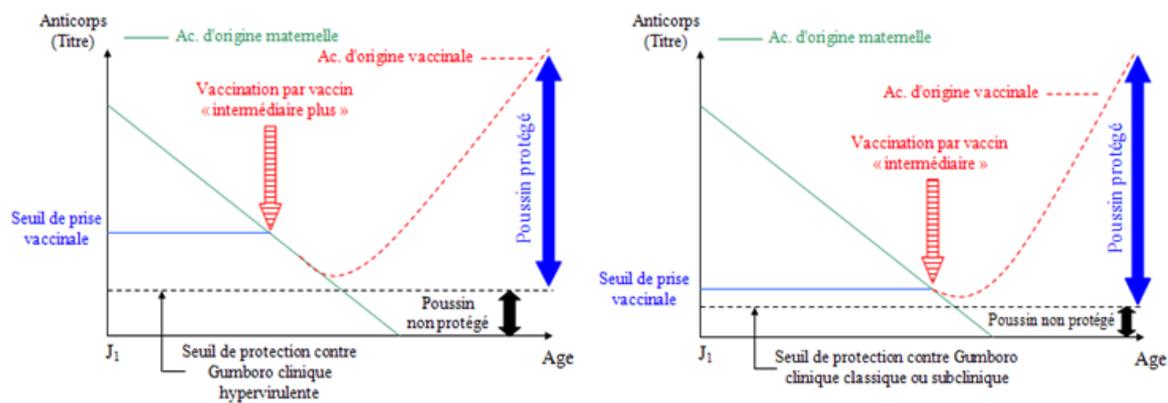


Figure 2.4 Concept de la protection continue. A gauche : cas de Gumboro avec forme hypervirulente. A droite : cas de Gumboro avec forme classique ou subclinique.

Il s'agit donc de vacciner au moment où les anticorps d'origine maternelle sont suffisamment bas pour permettre au virus vaccinal d'entraîner une séroconversion, mais pas au-dessous du seuil protecteur (anticorps encore protecteurs) : c'est le concept de la protection continue [192].

D'après la figure 2.4, deux cas se présentent :

- **En cas de Gumboro forme hypervirulente:** Il faut utiliser les souches vaccinales dites « intermédiaires plus » qui sont capables de passer la « barrière » des anticorps d'origine maternelle et permettent ainsi au virus vaccinal d'avoir une « avance » sur le virus sauvage (fig. 2.4 à gauche).
- **En cas de Gumboro forme classique ou en cas de forme subclinique :** dans ce cas, privilégier les souches dites « intermédiaires » qui sont moins agressives (absence de lésions sur la bourse de Fabricius) (fig. 2.4 à droite).

A titre d'exemple, les souches « intermédiaires plus » sont capables d'être efficaces au seuil de 500 unités ELISA tandis qu'une souche « intermédiaire » n'est active qu'en deçà d'un seuil de 125 à 250 unités ELISA (Kit IDEXX) [98].

2.9.3.4.2 Détermination de la date optimale de vaccination contre l'IBD

Le choix de la date de vaccination contre la Bursite Infectieuse doit tenir compte du concept de la protection continue, à partir duquel on a le raisonnement suivant :

- Vaccination précoce —————> vaccin neutralisé par AOM (risque d'échec vaccinal)
- Vaccination au moment optimum —————> vaccination efficace (protection).
- Vaccination tardive —————> risque d'infection par le virus sauvage.

A cet effet, deux approches sont proposées :

1- 1ère approche : vaccination à J1 ou au 18ème jour d'incubation (au couvoir)

➤ Vaccination par un virus vaccinal complexé avec les Ac anti-IBDV

Dans ce cas, le virus vaccinal vivant est mélangé à des anticorps anti-IBDV et le complexe antigène-anticorps est injecté in ovo au 18ème jour d'incubation, ou en sous cutané à J1 [129].

Cette démarche présente l'avantage d'offrir au virus vaccinal une « avance » sur le virus sauvage (surtout en région endémique) tout en le protégeant d'être neutralisé par les AOM. Aussi, l'innocuité sur la bourse de Fabricius en est meilleure [193].

Toutefois, cette méthode présente l'inconvénient de nécessiter des installations lourdes et une main d'œuvre formée. Une autre contrainte est à signaler : l'injection in ovo rompt les deux barrières, coquille et membrane de la chambre à air, faisant courir le risque d'une contamination réelle [193].

Comme exemples de vaccins Gumboro complexés avec des anticorps anti-IBDV, on peut citer :

-BURSAMUNE® IN OVO (FORT DODJE Santé Animale).

-CEVAC® TRANSMUNE IBD (Laboratoire CEVA).

➤ **Vaccination avec un vaccin Gumboro recombinant**

L'efficacité d'un vaccin recombinant exprimant la protéine VP2 du virus de la maladie de Gumboro et utilisant le vecteur herpes virus HVT face à une épreuve hypervirulente de la bursite infectieuse a été démontrée [194].

Le laboratoire Merial a développé un vaccin similaire au nom de VAXXITEK HVT+IBD à administrer au 18ème jour d'incubation en in ovo ou à J1 en sous cutané. Ce produit est destiné à prévenir les deux maladies de Marek et de bursite infectieuse.

2- 2ème approche: vaccination au seuil de non interférence avec les AOM

L'autre approche consiste à vacciner à la date à laquelle les résidus d'anticorps d'origine maternelle (AOM) sont à un niveau bas au point de ne pas neutraliser le vaccin, mais pas assez bas jusqu'à permettre au virus sauvage de s'y introduire (cf. concept de la protection continue).

Dans cette perspective, plusieurs études ont été menées, aboutissant à des méthodes et formules de calcul de la date optimum de vaccination contre la maladie de Gumboro (méthodes prédictives).

➤ **Méthode de Kouwenhoven**

A la fin des années quatre-vingt, Kouwenhoven et Van den BOS ont mis au point à l'institut Doorn (Holande) une formule qui modélise la décroissance des AOM chez le poulet de chair standard en fonction du temps. La vaccination est ainsi efficace à un seuil de 350 en ELISA pour les vaccins « intermédiaires » et 500 pour les vaccins « intermédiaires plus » (kit IDEXX, dilution 1/500) [195].

La formule de Kouwenhoven se calcule comme suit [196]:

$$D = \frac{\sqrt{A} - \sqrt{500}}{2,82} + 1$$

Avec :

D : jour de la vaccination.

A : moyenne des titres à J1.

500 : seuil d'inhibition pour les vaccins « intermédiaire plus ».

2,82 : facteur de diminution du taux d'anticorps pour poulet de chair standard.

+1 : car prise de sang à J1.

➤ **Méthode de Deventer**

L'institut Deventer (Holande) qui a intégré avec lui l'institut de Doorn a développé à partir de l'année 1990 une autre formule [98].

Les concepteurs de cette méthode [98] ont exigé deux conditions pour son application :

- Un minimum de 18 échantillons par lot est nécessaire -surtout pour les lots issus de différents parquets de reproducteurs
- La qualité des poussins qu'on va prélever doit être satisfaisante (éviter les poussins malades ou déshydratés).

Les avantages de cette méthode sont [98] :

- Cette formule est valable pour tous les types de volailles : poulets de chair, reproducteurs, pondeuses.
- Les prélèvements en vue d'un titrage pour la détermination de la date cible de vaccination peuvent s'effectuer de 1 à 10 jours après l'éclosion.
- La formule Deventer peut s'appliquer sur des titres homogènes et sur des titres hétérogènes.
- Elle s'applique avec les différents types de vaccins Gumboro.

La formule Deventer se calcule comme suit :

$$\text{Age Vaccination} = \{(\log_2 \text{ titre quartile 75\%} - \log_2 \text{ titre cible}) \times T_{1/2}\} +$$

$$\text{Age au prélèvement} + \text{jours additionnels (correction de 0-4 jours)}.$$

Avec :

-**Titre quartile 75%**: c'est le 3ème quartile. Donc contrairement à la formule de Kouwenhoven, ici on n'utilise pas la moyenne des titres.

-**T_{1/2}**: demi-vie des anticorps selon le type de production c'est-à-dire le temps au bout duquel la valeur initiale en anticorps chute de moitié (3 à 3,5 jours pour les poulets de chair standard ; 4,5 jours pour les futurs reproducteurs et poulets Label et 5,5 jours pour les poulettes démarrées) (De Wit, 2001).

-**Titre cible**: c'est le seuil d'inhibition du vaccin par les AOM. Ce seuil est fonction du type de vaccin utilisé :

- 125 : vaccin « intermédiaire ». Exemple : D78 (Intervet).
- 500 : vaccin « intermédiaire plus ». Exemple : IBDL (Ceva).
- 500-800 : vaccin à souche « chaude ». Exemple : 228 E (Intervet).
- 1000 : souches hypervirulentes. Nouveaux vaccins.

Ces seuils ont été fixés en travaillant sur le kit ELISA IDEXX. Ces titres cibles ont aussi été validés par d'autres laboratoires (Biocheck, LSI...).

- **Age au prélèvement** : c'est l'âge où s'est effectué le prélèvement.

- **Jours additionnels** : ce sont les jours à rajouter par rapport à l'âge au prélèvement et cela dans un intervalle de 0 à 4 jours. Ceci découle d'un principe de base sur lequel est fondée cette formule : c'est le principe de stabilité du titre des AOM pendant les quatre premiers jours de la vie du poussin [98]. Le tableau 2.3 présente le détail des jours à rajouter :

Tableau 2.3 Correspondance entre l'âge au prélèvement et la correction à rajouter (De Wit, 2001) [98].

Age au prélèvement	Jours additionnels
0	4
1	3
2	2
3	1
4	0
5	0
6	0
7	0
8	0
9	0
10	0

2.9.3.5 Résumé et synthèse des avantages et contraintes des différentes approches vaccinales contre la maladie de Gumboro

Avant l'émergence des souches hypervirulentes, la protection était suffisamment assurée par l'immunisation active des poules reproductrices avec l'utilisation combinée de vaccins vivants et inactivés [197] [198]. Une primo-vaccination par un vaccin vivant était effectuée durant les premières semaines d'âge. La dose de rappel était effectuée par un vaccin inactivé entre 16 et 18 semaines pour les reproductrices ponte et à 20 semaines pour les reproductrices chair [197].

Dans le même contexte, la vaccination de rappel avec l'IBDV inactivé en émulsion huileuse a démontré une immunogénicité bien supérieure chez les parentales et une persistance plus longue des anticorps d'origine maternelle (AOM) chez les poussins [197]. Les AOM ont pu fournir une immunité passive aux poussins pendant 4 à 5 semaines de vie [199] [200]. Il a été démontré que plus le niveau des AOM chez les poussins était élevé, plus la protection pouvait durer longtemps [201].

Cependant, le niveau de protection offert par les AOM dépend non seulement de la souche présente dans le vaccin inactivé, mais aussi du degré de virulence de la souche "sauvage" de l'IBDV [202]. Face à un virus Gumboro hautement virulent, un niveau plus élevé d'AOM est nécessaire pour obtenir une protection complète contre la maladie clinique [202].

L'émergence des vvIBDV a toutefois remis en question le programme de vaccination conventionnel [16]. Les vvIBDV ont été capables de surmonter les AOM chez les poussins et par conséquent ont affecté l'immunité passive de ces derniers [203] [202].

Compte tenu de l'évolution de la situation sur le terrain, l'immunisation avec des vaccins vivants devenait nécessaire pour protéger les poussins contre l'infection et la maladie causées par le vvIBDV pendant la période de croissance [203].

Il existe de nombreux choix de vaccins vivants, qui peuvent être classés subjectivement comme doux, doux à intermédiaire, intermédiaire, intermédiaire plus et "chaud" [89].

Les vaccins doux et intermédiaires ne sont pas efficaces contre la souche hypervirulente de l'IBDV, et sont par conséquent réservés aux souches classiques. Par contre, ils ont

l'avantage de ne pas provoquer de lésions sur la bourse de Fabricius, mais la date de leur administration doit être relativement tardive car ils sont neutralisés par les AOM et ne sont efficaces qu'en deçà d'un seuil de 125 à 250 unités ELISA (Kit IDEXX) [204] [23].

Par ailleurs, les vaccins intermédiaires plus et chauds sont efficaces contre vvIBDV. Ils ont toutefois l'inconvénient d'avoir une faible innocuité envers la bourse de Fabricius en provoquant des lésions qui peuvent induire une immunodépression chez certains sujets ou influencer négativement la réponse immune envers les autres vaccinations [205] [131] [89]. Cette contrainte est par contre contrebalancée par un autre avantage, c'est de pouvoir être utilisés à une date relativement plus précoce car ces vaccins sont capables de franchir la barrière des AOM à un seuil de de 500 unités ELISA [204] [23]. Becheur et Oumouna [23] ont rapporté qu'une primovaccination avec un vaccin intermédiaire plus dans la période 14^{ème} -16^{ème} jour procurait une protection satisfaisante aux poulets de chair vaccinés, et cela suite au calcul prédictif du moment optimal de la vaccination contre la Gumboro.

De ce qui précède, l'enjeu est de trouver un équilibre entre efficacité (immunogénicité) et innocuité (absence de pathogénicité résiduelle), ou comme l'ont décrit certains auteurs, c'est de résoudre le dilemme entre efficacité et sécurité lors de la vaccination contre la Gumboro [151]. A cet effet, la solution qui était recherchée à ce dilemme était de développer des vaccins qui ont l'avantage de ne pas être neutralisés par les AOM même si ces derniers sont à un niveau très élevé, et de ne pas induire de lésions au niveau de la BF, même si la souche vaccinale utilisée est de type intermédiaire plus.

Différentes approches ont été explorées pour atteindre ces objectifs. Toutefois, seuls deux types de vaccins de nouvelle génération ont été développés et commercialisés avec succès : les vaccins vectorisés à base de virus herpétique de dinde (HVT) et les vaccins à complexes immuns [151].

Le premier concept réussi a été l'établissement de vaccins à complexes immuns (Icx). Ces vaccins se composent d'un mélange de sérum hyperimmunitaire neutralisant spécifique (ou « facteur neutralisant le virus ») avec un virus vaccinal. Cela permet de vacciner de jeunes poussins même avec une souche qui serait trop virulente [206], avec l'avantage d'être efficace même en présence de résidus importants d'AOM [207] ; l'administration se fait

par injection sous-cutanée à 1 jour d'âge au couvoir ou, alternativement, lorsque le matériel d'injection dans l'œuf est disponible, peut être également adaptée pour la vaccination in ovo au 18^e jour d'incubation [208]. Bien que le mécanisme d'action soit encore mal compris, le complexe du IBDV avec des anticorps spécifiques provoque un retard dans la détection du virus d'environ 5 jours, réduisant ainsi la charge virale dans la BF et, par conséquent, épargnent cet organe d'éventuelles lésions [179]. Le virus vaccinal serait ainsi relargué du complexe immun progressivement, évitant une neutralisation par les AOM et assurant une disponibilité biologique du vaccin au moment de la disparition de ces anticorps, tout en protégeant la bourse de Fabricius.

Le second concept repose sur le vaccin contre la maladie de Marek largement utilisé, composé du sérotype 3 HVT, qui est bien connu pour sa sécurité et sa faible sensibilité à l'interférence des AOM, c'est pourquoi il a été développé comme vecteur pour l'IBD [209]. En effet, des études comparatives ont montré que les AOM interfèrent avec la réponse humorale lors de la vaccination avec des vaccins vivants intermédiaires, mais n'ont aucun impact sur l'immunisation avec des vaccins vectorisés HVT contenant la séquence VP2 [210] [209] [211]. Il a également été observé que ce vaccin vecteur offrait une protection contre un challenge avec un IBVD variant [212]. Ce vaccin vecteur élimine le dilemme entre sécurité et efficacité lors de la vaccination contre l'IBD auquel les vétérinaires avicoles sont fréquemment confrontés. En outre, il protège également contre la maladie de Marek, et son utilisation au couvoir, où le mode opératoire vaccinal en injectable est très bien contrôlé, réduit le besoin d'administrer le vaccin par voie orale dans les élevages avicoles.

Dans le cas où ces solutions à base de vaccins à complexes immuns, ou de vaccins vectorisés n'ont pu être adoptées, l'utilisation des méthodes prédictives, consistant à calculer la date optimale de vaccination à partir de formules de Deventer ou de Kouwenhoven (comme expliqué dans les pages précédentes), reste une solution réalisable et à moindre coût car ne nécessitant que le calcul des titres d'AOM par le test ELISA sur des prélèvements sérologiques effectués à J1 pour la méthode Kouwenhoven, ou entre J1 et J10 pour la méthode Deventer. Pour ce qui est des lésions induites par l'utilisation de souches virulentes moins atténuées (intermédiaires plus par exemple), il convient de peser le pour et le contre entre une forme clinique hypervirulente qui pourrait décimer le cheptel, et des effets secondaires de ce vaccin sur la BF, ceci bien sûr en absence d'infrastructures

et de personnel formé qui pourrait assurer la solution d'une vaccination au couvoir par des vaccins à complexes immuns ou vectorisés [23].

2.9.3.6 Echec vaccinal contre la maladie de Gumboro

Toutes les causes relatives à l'échec vaccinal, traitées de façon détaillée dans les pages précédentes, sous le titre : "Echec vaccinal dans les élevages avicoles", sont extrapolables au cas de la vaccination contre l'IBD, et qui ont été regroupées en :

1. Facteurs liés au vaccin lui-même ;
2. Facteurs liés à la méthode de vaccination ;
3. Facteurs liés aux volailles à vacciner (statuts sanitaire et immunitaire de départ) ;
4. Facteurs liés à la pression virale à l'intérieur du bâtiment d'élevage.

A cet effet, on peut résumer ici quelques causes d'échec de la vaccination contre la bursite infectieuse, qui sont énumérées comme suit :

- Utilisation d'une souche vaccinale qui n'est pas compatible avec la souche du virus "sauvage" (circulant sur le terrain), comme la prescription d'un vaccin Gumboro « intermédiaire » pour prévenir une forme hypervirulente qui a déjà sévit dans le bâtiment en question, ou qui sévit dans des poulaillers mitoyens.
- Vaccination à une date trop précoce où les anticorps anti-IBDV d'origine maternelle (AOM) seraient capables de neutraliser le vaccin dirigé contre la Gumboro [23] (voir "Détermination de la date optimale de vaccination" dans les pages précédentes).
- Vaccination à une date trop tardive où le virus sauvage pourrait prendre une "avance" sur le virus vaccinal et par conséquent provoquerait la maladie.
- Inactivation du virus vaccinal par des résidus de désinfectants dans l'eau de boisson, les canalisations, les abreuvoirs...etc
- Accès insuffisant d'une grande partie des volailles à l'eau vaccinale à cause de surdensité, de nombre insuffisant d'abreuvoirs, de canalisations bouchées à une partie du bâtiment.....etc

- Statut immunitaire déficient au moment de la vaccination en raison de pathologies immunodéprimantes ou d'antécédent de forme subclinique de Gumboro avec son corollaire d'immunosuppression.
- Pression virale (en IBDV) très élevée dans le bâtiment d'élevage en raison d'opérations de désinfection et de vide sanitaire -d'avant mise en place- mal effectuées.

Sans oublier certaines causes davantage liées à un manque de professionnalisme et de rigueur de la part des éleveurs et des vétérinaires. Parmi celles-ci figurent : la rupture de la chaîne de froid lors du stockage des vaccins, une mauvaise gestion des dates de péremption, l'absence d'un examen général du cheptel avant la vaccination, des installations inadaptées au mode vaccinal, ou encore un personnel mal formé. Ce dernier point est particulièrement critique dans le cas des vaccinations individuelles (par voie injectable), qu'il s'agisse de vaccins administrés au premier jour de vie ou au 18^e jour d'incubation, ou bien de vaccins inactivés destinés aux reproductrices avant l'entrée en ponte, afin de garantir un taux d'anticorps élevé et transmissible à la descendance par voie vitelline [23].

2.9.3.7 Listes de différents types de vaccins Gumboro disponibles sur le marché.

Voir appendice E.

CHAPITRE 3

PARTIE EXPERIMENTALE : CARACTERISATION

MOLECULAIRE ET ETUDE DE L'EFFET HISTOPATHOLOGIQUE

DU VIRUS DE LA GUMBORO (IBDV) ISOLE A PARTIR DE

QUELQUES ELEVAGES AVICOLES DU CENTRE ET DE L'OUEST

DE L'ALGERIE.

Une partie des résultats présentés dans ce chapitre, a été publiée dans (Becheur et al., 2024) [213], selon la référence suivante :

Becheur, M., Lounas, A., Messaoudi, O., Oumouna-Benachour, K., & Oumouna, M. (2024). Molecular Characterization of Infectious Bursal Disease Virus Isolated From Broiler And Pullet Flocks In Algeria. *Journal Of Animal And Plant Sciences-JAPS*, 34(1), 73-89. <https://doi.org/10.36899/JAPS.2024.1.0696> (voir article intégral en appendice I)

3.1 Problématique

En Algérie, la maladie de Gumboro (IBD) a été observée pour la première fois dans la production avicole à la fin des années 1980 [24]. En 2000, le séquençage partiel du gène VP2 de sept isolats d'IBDV a fait suspecter la présence d'IBDV hypervirulent [25]. Après quelques années, le tableau clinique de l'IBD dans différentes régions du pays a évolué, avec des taux de mortalité nettement plus élevés par rapport à la forme classique. Ceci a conduit à l'hypothèse que des souches hypervirulentes ont pu se propager à la suite de mutations génétiques au sein du génome de ce virus.

Dans ce contexte, des études ont été effectuées et ont pu confirmer cette hypothèse, faisant état de la présence de souches hypervirulentes (vvIBDV) dans nos élevages avicoles.

A cet effet, une large gamme de vaccins contre la Gumboro a été utilisée dans les différents élevages du pays. Cependant, les pertes dues à cette maladie n'ont pu diminuer, probablement en raison de la persistance de la circulation du vvIBDV, connaissant que cette souche virale est impliquée dans un nombre élevé de cas d'échecs de vaccination anti-Gumboro, comme signalé dans diverses régions à travers les cinq Continents [28] [21].

3.2 Objectifs

La présente étude avait pour but de vérifier la persistance du pathotype hypervirulent de l'IBDV (vvIBDV) dans quelques régions de l'Algérie à travers une caractérisation moléculaire des souches circulantes. Elle visait également à établir la relation entre les virus identifiés et les souches de référence d'IBDV en Algérie et ailleurs dans le monde. Par ailleurs, un examen histopathologique a été réalisé sur la BF des oiseaux étudiés pour analyser l'impact de ces souches virales sur cet organe.

3.3 Choix des élevages et données relatives aux cheptels avicoles étudiés

Il est important de souligner que toutes les procédures expérimentales appliquées dans le cadre du présent travail ont été approuvées par le Comité institutionnel de protection des animaux de l'Administration nationale de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique algérienne (numéro d'approbation éthique : 98-11, Loi du 22 août 1998) et ont été menées conformément aux recommandations du « Guide pour le soin et l'utilisation des animaux de laboratoire ».

Cinquante-cinq oiseaux suspectés atteints de Gumboro ont été prélevés à partir de onze élevages avicoles situés dans l'Est et le Centre de l'Algérie entre 2019 et 2020.

Les élevages situés au Centre sont répartis dans les wilayas de Chlef (Dairas d'Ouled Fares et de Zeboudja) et de Bouira (Dairas de Bechloul et Bir Ghbalou) ; ceux situés à l'Est appartiennent à la wilaya de Batna (daïras de Batna et El Madher), comme illustré sur la figure 3.1.

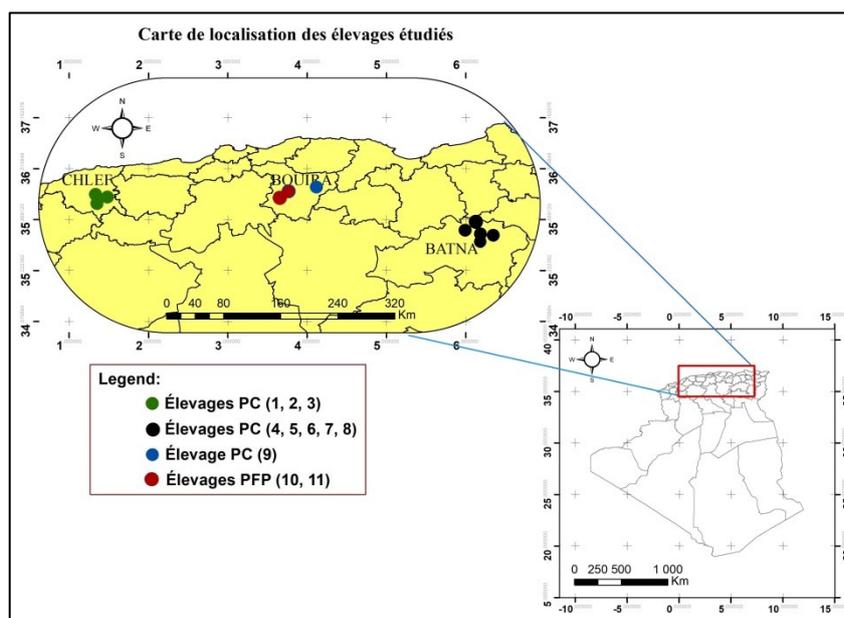


Figure 3.1 Carte de localisation des élevages étudiés.

Les foyers objets de cette suspicion ont été identifiés sur des exploitations de poulets de chair (élevages N°1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 et 9) et de poulettes (élevages N°10 et 11) en se basant initialement sur les signes cliniques et les lésions macroscopiques.

Les élevages concernés par la présente étude ont été choisis sur la base d'informations parvenues à partir de vétérinaires du terrain qui ont une expérience dans la pathologie aviaire et qui ont accepté de coopérer.

Le taux de mortalité chez les poulets de chair affectés variait de 2 % à 9 %, tandis que chez les poulettes, il était de 71 % et 47,8 % dans les élevages N°10 et 11, respectivement. Dans les bâtiments avicoles visités, les signes cliniques étaient essentiellement une réduction de l'appétit et de l'activité, une diarrhée aqueuse blanchâtre, une prostration, des plumes ébouriffées, un regroupement, une somnolence et la mort.

À l'autopsie, des lésions macroscopiques ont été observées dans la bourse de Fabricius des volailles examinées, représentées par un œdème, des hémorragies et une hypertrophie de cet organe. Par ailleurs, des pétéchies et des hémorragies ont été observées sur les muscles du bréchet et de la cuisse.

Tous les cheptels étudiés ont été vaccinés contre la maladie de Gumboro, à l'exception des poulettes du troupeau n°10. Le vaccin Gumboro utilisé était de souche "intermédiaire", à l'exception du troupeau n°3, qui a reçu un vaccin atténué.

Les informations concernant la région d'échantillonnage, le type d'élevage, la date de la première vaccination contre l'IBD, les souches vaccinales utilisées, l'âge des oiseaux au moment des premières manifestations cliniques, le taux de mortalité et l'âge au moment de l'échantillonnage sont résumées dans le Tableau 3.1

Tableau 3.1 Historique des foyers d'IBD de la présente étude

N° du cheptel	Région	Type d'élevage	Âge à la primovaccinat° contre l'IBD	Vaccins utilisés contre l'IBD	Âge au moment de l'IBD	Taux de mortalité (%)	Âge au prélèvement
1	C (W02)	P de chair	J 16	Intermédiaire	J 32	6,2	J 33
2	C (W02)	P de chair	J 15	Intermédiaire	J 24	8%	J 26
3	C (W02)	P de chair	J 15	Vaccin atténué	J 27	4,5%	J 29
4	E (W05)	P de chair	J 15	Intermédiaire	J 27	2,2%	J 31
5	E (W05)	P de chair	J 15	Intermédiaire	J 30	3%	J 33
6	E (W05)	P de chair	J 11	Intermédiaire	J 21	9%	J 24
7	E (W05)	P de chair	J 13	Intermédiaire	J 37	4,6%	J 38
8	E (W05)	P de chair	J 14	Intermédiaire	J 28	3,9%	J 29
9	C (W10)	P de chair	J 14	Intermédiaire	J 20	1,8%	J 28
10	C (W10)	Poulettes	Non vaccinées	Non vaccinées	J 24-26	71%	J 27 30
11	C (W10)	Poulettes	J 20	Intermédiaire	J 24-27	47,8%	J 24 27

IBD = Infectious bursal disease (maladie de Gumboro) C = Centre E = Est

3.4 Méthodes utilisées

3.4.1 Histopathologie

3.4.1.1 Prélèvement d'organes (bourses de Fabricius)

Cinquante-cinq bourses de Fabricius provenant d'oiseaux récemment morts ou sacrifiés ont été prélevées à partir de 11 cheptels avicoles suspectés atteints d'IBD et conservées dans une solution tamponnée de formol à 10% en vue d'une analyse histopathologique. Seules les BF présentant des lésions évoquant la Gumboro (œdèmes, hémorragies et hypertrophie) ont été élues pour l'examen microscopique.

3.4.1.2 Mode opératoire

Des coupes sur organe ont été effectuées, dont les fragments obtenus ont subi une déshydratation à l'aide d'alcools à concentrations croissantes (70%, 80%, 90%, 95% et 100%). Les tissus ainsi déshydratés ont été éclaircis dans du xylène puis infiltrés dans de la paraffine fondue. Des sections (5 µm) ont été découpées à l'aide d'un microtome à partir de tissus enrobés dans des blocs de paraffine. Les tissus obtenus ont été montés sur des lames de verre propres et exemptes de graisse, conservés à 25 °C, puis colorés avec l'hématoxyline et l'éosine (H&E) [214]. Les lames préparées ont été examinées au microscope optique à des grossissements de 20x, 100x et 200x. Des photomicrographies des tissus ont été prises à l'aide d'un appareil photo à objectif microscopique numérique.

3.4.2 Caractérisation moléculaire

3.4.2.1 Collecte des échantillons

Cinquante-cinq bourses de Fabricius fraîches ont été prélevées à partir de 11 élevages de poulets de chair et de poulettes suspectés atteints de maladie de Gumboro. Chaque BF est ouverte, puis fermement posée sur une zone d'une carte Whatman connue sous le nom Flinders Technology Associates® (carte FTA® ou FTA® Classic Card), puis retirée laissant ainsi sur cette zone une "empreinte" physique de cet organe, comme le montre bien la figure 3.2. Ces cartes sont adaptées pour capturer et conserver l'ARN viral, ainsi que pour faciliter son transport à température ambiante [215].

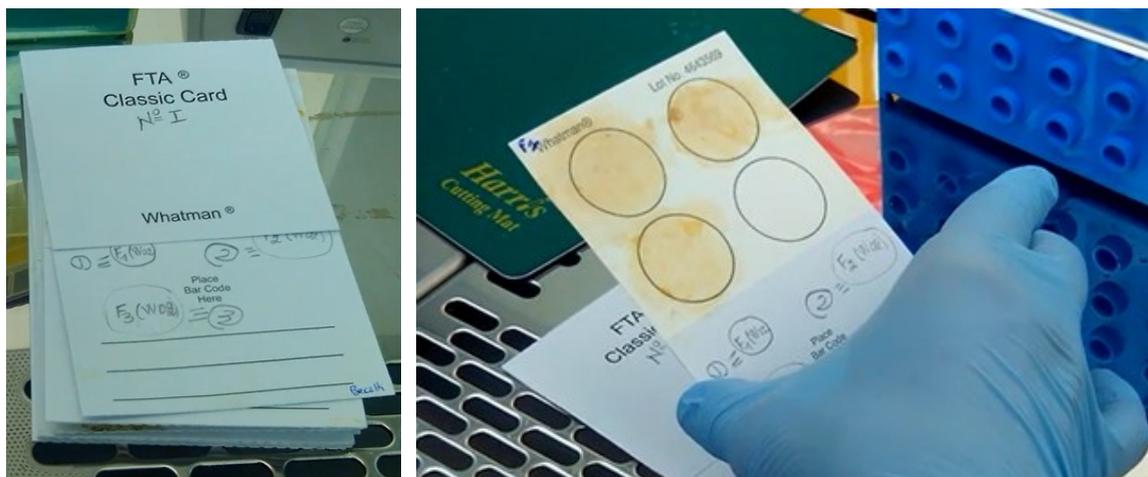


Figure 3.2 A gauche : carte FTA® vue de l'extérieur. A droite : collecte d'échantillon sur 3 zones d'une carte FTA® à partir de BF issues de 3 foyers à suspicion d'IBD (Photo personnelle).

3.4.2.2 Extraction de l'ARN viral à partir des cartes FTA®

Trois disques (2 mm de diamètre) ont été découpés de la zone tachée de chaque carte FTA® (Whatman, GE Healthcare, Royaume-Uni) à l'aide d'un "puncher" stérile (Harris Micro-Punch) et placés dans des tubes Eppendorf de 1,5 ml (Figure 3.3). Pour chaque tube contenant des disques de papier FTA®, 250 µL de tampon TE ont été ajoutés, vortexés, et incubés pendant 10 minutes à 25 °C [215] [216]. Le kit QIAamp® Viral RNA Mini (QIAGEN GmbH, Allemagne) a été utilisé pour extraire l'ARN de la carte FTA®. L'ARN extrait a été stocké à -20 °C jusqu'à l'analyse.



Figure 3.3 A gauche : trois disques découpés par un "puncher" stérile sur une zone d'une carte FTA® contenant l'empreinte physique de bourses de Fabricius. A droite : les 3 disques découpés placés dans des tubes Eppendorf de 1,5 ml en vue d'en extraire l'ARN (Photo personnelle).

Les détails de l'extraction de l'ARN viral sont ci-dessous présentés (conformément aux instructions du fabricant du kit QIAamp® Viral RNA Mini) :

3.4.2.2.1 Matériel nécessaire pour l'extraction de l'ARN viral

- Cartes FTA® (Whatman, GE Healthcare, Royaume-Uni) tachées avec l'échantillon
- Harris Micro-Punch stérile (ou tout autre perforateur stérile)
- Tubes Eppendorf 1,5 ml RNase-free
- Micropipettes à volume variable et cônes de pipetage
- Tampon TE
- Vortex
- Centrifugeuse réfrigérée
- Solution d'éthanol absolu
- Bain-marie
- Kit d'extraction d'ARN (QIAamp® Viral RNA Mini)
 - Tampon de lyse
 - Tampon de liaison
 - Solution de lavage A
 - Solution de lavage B (préparée avec de l'éthanol absolu)
 - Solution d'élution
 - Colonnes de silice et tubes de collection

3.4.2.2.2 Étapes du protocole de l'extraction de l'ARN viral

1. **Préparation des disques de carte FTA :**
 - À l'aide du **Harris Micro-Punch**, découpez **trois disques** (2 mm de diamètre) de la zone tachée de chaque carte FTA.
 - Placez les disques dans un **tube Eppendorf 1,5 ml RNase-free** (Figure 3.2)
2. **Prétraitement des disques FTA :**
 - **Ajoutez 250 µl de tampon TE** au tube contenant les disques.
 - **Vortexez** le tube pour bien mélanger, puis **incubez** à température ambiante (environ 25°C) pendant **10 minutes**.
 - **But :** Cette étape permet de libérer l'ARN viral des disques de la carte FTA, rendant l'ARN accessible pour l'extraction.

3. Lyse de l'échantillon :

- Ajoutez **500 µl de tampon de lyse** au tube contenant les disques FTA traités.
- **Vortexez** pour homogénéiser le mélange.
- Incubez pendant **10 minutes à température ambiante**.
- **But** : Le tampon de lyse brise les liaisons protéiques et libère davantage l'ARN viral, préparant l'échantillon pour la liaison à la colonne de silice.

4. Liaison de l'ARN à la colonne de silice :

- Ajoutez **700 µl de tampon de liaison** au tube Eppendorf.
- **Vortexez** pour mélanger.
- Transférez le mélange dans une **colonne de silice montée sur un tube de collection**.
- **Centrifugez à 13 000 trs/min pendant 1 minute à +4°C**.
- **But** : Cette étape permet de lier l'ARN viral à la matrice de silice dans la colonne, tandis que le liquide est éliminé.

5. Lavages de la colonne :

- **Lavage A** :
 - Ajoutez **500 µl de la solution de lavage A** à la colonne.
 - **Centrifugez à 13 000 trs/min pendant 1 minute à +4°C**.
 - Éliminez le liquide récupéré dans le tube de collection.
- **Lavage B** :
 - Ajoutez **500 µl de la solution de lavage B** (préparée avec de l'éthanol).
 - **Centrifugez à 13 000 trs/min pendant 1 minute à +4°C**.
 - Éliminez le liquide collecté, puis effectuez une **centrifugation à sec** (sans ajout de solution) pour éliminer toute trace résiduelle d'éthanol.
- **But** : Les lavages éliminent les contaminants comme les protéines, les sels et autres impuretés, en laissant l'ARN viral purifié sur la colonne.

6. Elution de l'ARN :

- **Placez la colonne** dans un nouveau tube Eppendorf RNase-free.
- Ajoutez **25 µl de solution d'éluion** directement sur la membrane de la colonne.

- **Incubez** à température ambiante pendant **1 minute**.
- **Centrifugez** à **13 000 trs/min** pendant **1 minute** à **+4°C** pour récupérer l'ARN viral purifié.
- **But** : Cette étape libère l'ARN viral purifié de la matrice de silice dans la colonne, recueillant l'ARN dans le tube.

7. Post-traitement et stockage :

- Chauffez le tube contenant l'ARN purifié dans un **bain-marie à 56°C** pendant **5 minutes**.
- Laissez le tube revenir à température ambiante pendant quelques minutes.
- Stockez l'ARN à **-80°C** jusqu'à son utilisation pour des analyses ultérieures (par exemple, RT-PCR), ou à **-20°C** si l'analyse se fera plus tôt.
- **But** : Le chauffage à 56°C aide à éliminer toute RNase résiduelle, stabilisant l'ARN pour une conservation à long terme.

La figure 3.4 résume les différentes étapes ci-dessus mentionnées.

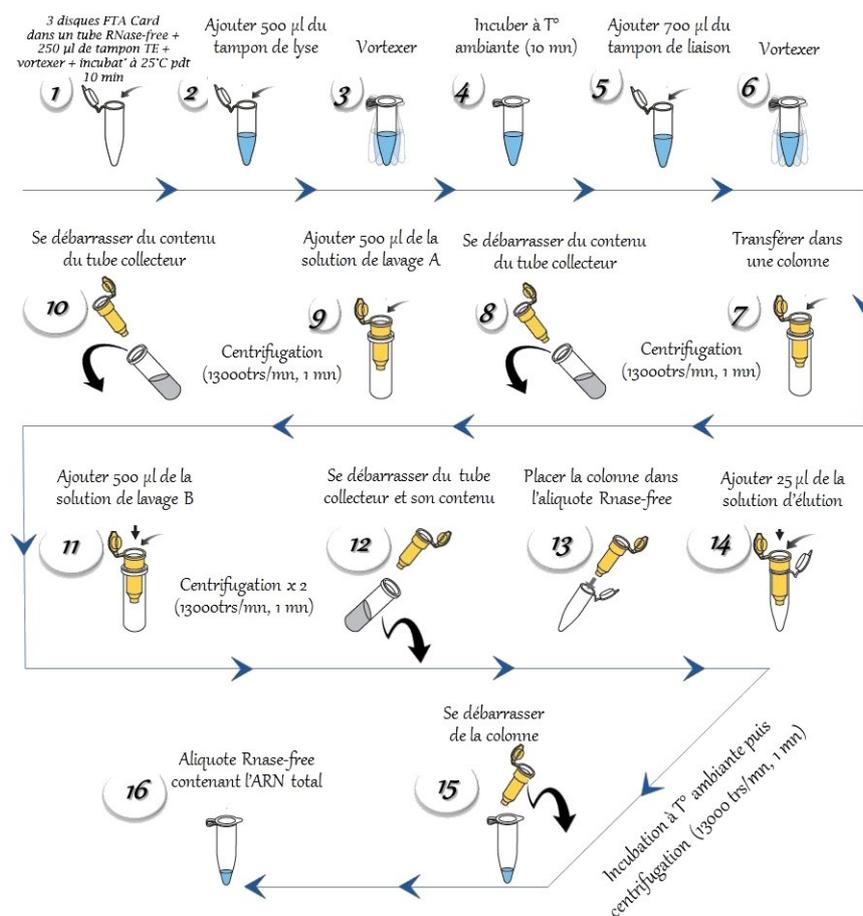


Figure 3.4 Etapes d'extraction de l'ARN viral par adsorption sur membrane de silice (schéma emprunté à Boudaoud, (2015) [26] ; avec étape N°1 adaptée au contexte expérimental de la présente étude).

3.4.2.3 Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

3.4.2.3.1 Description générale

La pureté et la concentration de l'ARN viral extrait des cartes FTA ont été déterminées à l'aide d'un spectrophotomètre NanoDrop (NanoDrop 1000c, Thermo Scientific, Waltham, USA). Une RT-PCR en une étape a été réalisée à l'aide d'un thermocycleur automatique d'ADN (Chromo-4; Bio-Rad). Un kit RT-PCR en une étape (Qiagen, Allemagne) a été utilisé selon les instructions du fabricant, permettant une combinaison optimale de la transcription inverse et de l'amplification PCR dans un seul tube, réduisant ainsi les risques de contamination croisée.

Les amorces spécifiques VP2 F 5'-GCCGATGATTACCAATTC-3' et VP2 R 5'-GTGACGGGACGGAGGGCC-3' ont été utilisées pour amplifier une séquence de 422 pb de la région hypervariable du gène VP2 de l'IBDV (Virus de la bursite infectieuse des volailles), couvrant les positions 762 à 1184 pb. Cette région est cruciale car elle contient des épitopes neutralisants qui sont sujets aux mutations sous la pression immunitaire, ce qui en fait une cible idéale pour la détection et la caractérisation du virus.

3.4.2.3.2 Mise en œuvre de la RT-PCR

- **Matériel utilisé :**

- Thermocycleur Chromo-4; Bio-Rad
- Hotte à flux laminaire
- Micropipettes avec cônes à filtres pour PCR
- Tubes PCR
- Solution mère des amorces (100 µM)
- **Kit PreMix (Master Mix) one-step RT-PCR (Qiagen)**, contenant:
 - **5x QIAGEN OneStep RT-PCR Buffer** son rôle est de maintenir un environnement optimal pour les réactions enzymatiques lors de la transcription inverse et de l'amplification. Ce tampon est préconcentré (5x), ce qui permet une dilution lors de la préparation du mélange réactionnel.
 - **QIAGEN OneStep RT-PCR Enzyme Mix** contient une enzyme de transcription inverse qui convertit l'ARN en ADNc. Cette enzyme est également formulée pour une efficacité élevée dans la transcription inverse.

- **QIAGEN OneStep RT-PCR Enzyme Mix** contient également une DNA polymerase (Taq) pour amplifier l'ADNc.

- Le **dNTP Mix** (contenant 10 mM de chaque dNTP), essentiel pour la synthèse de l'ADN lors de la PCR.

- **RNase-free water** est fournie pour diluer les réactifs et éviter la dégradation de l'ARN.

- L'ajout d'un **RNase inhibitor** est optionnel mais recommandé pour protéger l'ARN de la dégradation.

- **Template RNA (ARN matrice)** ajouté en fonction de la concentration, allant de 1 pg à 2 µg par réaction.

Avant de réaliser le mélange réactionnel, une solution de stock concentrée à 25 µM a été préparée à partir de la solution mère des amorces F et R. Sous hotte à flux laminaire, un mélange réactionnel a été préparé dans des tubes PCR pour un volume total de 25 µl comprenant :

- 8 µl de PreMix RT-PCR
- 1 µl de chaque amorce F et R (prélevé dans la solution de stock à 25 µM)
- 5 µl d'extrait d'ARN (échantillon)
- 10 µl d'eau RNase-free

Un contrôle négatif a été inclus dans la réaction, composé de 8 µl de PreMix, 1 µl de chaque amorce F et R, et 15 µl d'eau RNase-free pour un volume total de 25 µl.

La réaction de RT-PCR a été effectuée comme suit (Qiagen) :

- **Phase de transcription inverse (RT)** : 20 minutes à 50 °C pour permettre la synthèse de l'ADNc à partir de l'ARN viral.
- **Activation initiale de la PCR** : 15 minutes à 95 °C pour activer la polymérase et dénaturer l'ADNc.
- **Phase de PCR (35 cycles)** :
 - Dénaturation : 94 °C pendant 30 secondes.
 - Hybridation : 59 °C pendant 40 secondes, permettant un appariement spécifique des amorces aux séquences cibles.
 - Extension : 72 °C pendant 1 minute pour l'élongation des brins d'ADN.
- **Extension finale** : 72 °C pendant 10 minutes pour s'assurer que toutes les molécules d'ADN sont complètement allongées.

Des témoins positifs (souche vaccinale de l'IBDV) et négatifs (eau exempte de nucléase) ont été inclus dans chaque série de PCR pour garantir la validité des résultats obtenus.

3.4.2.3.3 Contrôle des produits de RT-PCR par électrophorèse sur gel d'agarose

Après l'amplification, les produits de la RT-PCR ont été soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose à 2 % contenant du bromure d'éthidium. Le gel a été visualisé à l'aide d'un trans-illuminateur UV, permettant l'observation des bandes correspondant aux produits amplifiés. Les produits de PCR ont ensuite été purifiés à l'aide d'un kit d'extraction de gel QIA-quick (Qiagen) suivant les instructions du fabricant, pour une utilisation ultérieure dans des analyses de séquençage.

3.4.2.4 Séquençage de la région hypervariable du gène VP2

Les produits de PCR purifiés ont été séquencés à l'aide d'un kit de séquençage par cycle BigDye Terminator V3.1 (Perkin-Elmer, Foster City, CA, USA), basé principalement sur la méthode de Sanger qu'on va développer ici :

3.4.2.4.1 Principe de la méthode de Sanger

1- Description des étapes

- **Amplification de l'ADN** : Tout d'abord, l'ADN à séquencer est amplifié par PCR (réaction en chaîne par polymérase). Ce processus produit une grande quantité d'une séquence d'ADN spécifique à partir d'une petite quantité initiale.
- **Mélange réactionnel** : Le mélange pour la PCR contient les ingrédients classiques, tels que la Taq polymérase (une enzyme qui synthétise l'ADN), des dNTPs (désoxyribonucléotides, les "briques" de l'ADN), et une amorce (qui peut être F ou R, pour Forward ou Reverse).
- **Incorporation des ddNTPs** : En plus des dNTPs, le mélange contient des ddNTPs (didéoxynucléotides), qui sont des versions modifiées des nucléotides habituels. Lorsqu'un ddNTP est incorporé dans la chaîne d'ADN en cours de synthèse par la Taq polymérase, il arrête la synthèse de l'ADN. Ceci est dû au fait que les ddNTPs manquent d'un groupe hydroxyle nécessaire à l'ajout du prochain nucléotide.
- **Formation de fragments d'ADN** : L'incorporation aléatoire de ces ddNTPs par la Taq polymérase génère des fragments d'ADN de différentes longueurs. Chaque

fragment se termine par un ddNTP, donc la dernière base de chaque fragment peut être un A, C, T ou G, selon le ddNTP incorporé.

- **Préparation des milieux réactionnels** : Pour chaque échantillon d'ADN, quatre mélanges réactionnels sont préparés, chacun contenant l'un des quatre types de ddNTP (ddATP, ddCTP, ddTTP ou ddGTP).

2- Migration électrophorétique et lecture de la séquence

- **Migration sur gel de polyacrylamide** : Les produits de la réaction de séquençage sont ensuite séparés par électrophorèse sur un gel de polyacrylamide, un gel très résolutif qui permet de distinguer des fragments d'ADN qui diffèrent par une seule paire de bases. Les fragments les plus courts migrent plus rapidement que les plus longs.
- **Détermination de la séquence** : La position des fragments sur le gel révèle l'ordre des nucléotides dans la séquence d'ADN, car chaque bande sur le gel correspond à un fragment se terminant par un des quatre ddNTPs. En identifiant le ddNTP présent à l'extrémité de chaque fragment, on peut déterminer la séquence complète du brin d'ADN. La figure 3.5 illustre ce qui est ci-dessus décrit :

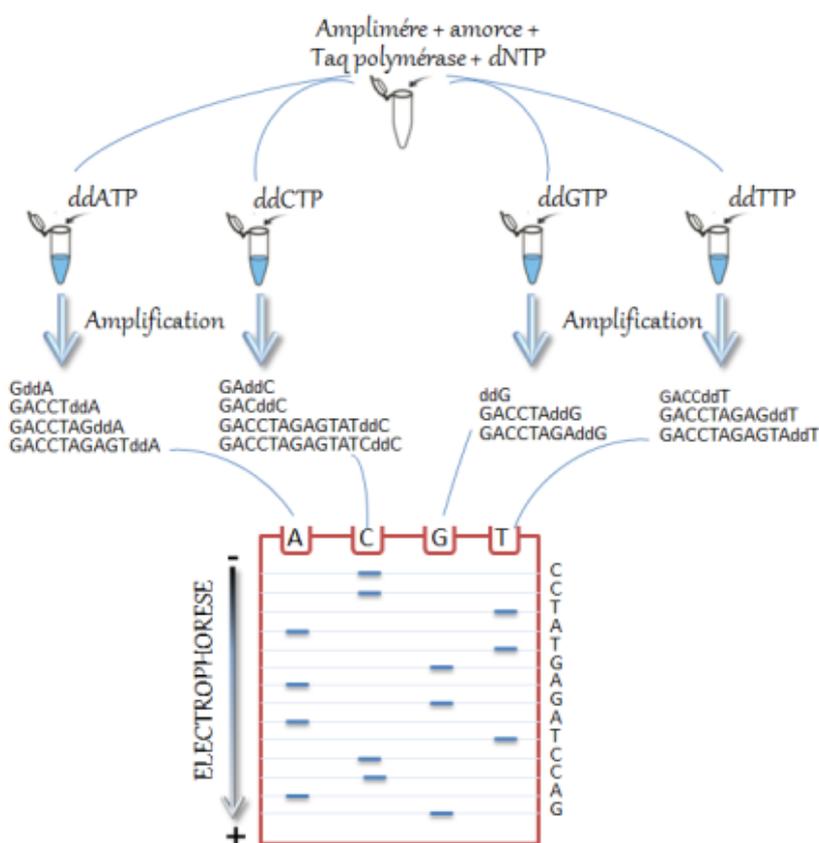


Figure 3.5 Principe de la méthode de Sanger (Boudaoud, 2015) [26]

3.4.2.4.2 Déroulement du séquençage

1- Préparation des produits PCR : Purification des amplimères

- **Problèmes avec les produits PCR bruts** : Les produits PCR bruts peuvent contenir des résidus d'amorces, des dNTPs non consommés, et des fragments d'ADN simples brins. Ces contaminants peuvent interférer avec la réaction de séquençage et doivent donc être éliminés avant le séquençage.
- **Purification avec des enzymes** :
 - **Exonucléase I** : Cette enzyme dégrade les fragments d'ADN simples brins, éliminant ainsi les amorces résiduelles.
 - **SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase)** : Cette enzyme hydrolyse (détruit) les dNTPs libres qui n'ont pas été incorporés dans la réaction de PCR.
- **Mélange réactionnel pour la purification** : Dans un tube PCR, un mélange est préparé contenant de l'eau ultrapure, de l'Exonucléase I, et du SAP. Ce mélange est ajouté aux produits PCR dans une plaque PCR.
- **Thermocyclage pour la purification** :
 - **37°C pendant 15 minutes** : Cette température permet l'optimisation de l'action des enzymes Exonucléase I et SAP.
 - **80°C pendant 15 minutes** : Cette étape inactive les enzymes pour qu'elles n'interfèrent pas avec les étapes suivantes.
 - **4°C** : Les échantillons sont maintenus au froid jusqu'à leur utilisation pour minimiser toute dégradation potentielle.

2- Réaction de séquence : les fragments de PCR obtenus et purifiés (comme ci-dessus expliqué) ont ensuite été séquencés (détails en appendice F).

3- Purification de la réaction de séquence : les produits de la réaction de séquence obtenus ont été purifiés puis préparés à l'électrophorèse (Appendice G).

4- Détermination de la séquence des amplimères: les produits de la réaction de séquence ont été ensuite chargés sur une plaque de séquenceur avec électrophorèse capillaire à l'aide d'un analyseur génétique ABI PRISM 3730xl développé par Applied Biosystems (ABI), USA (voir détails en appendice H). Les séquences nucléotidiques obtenues ont été ensuite assemblées et éditées à l'aide du logiciel BioEdit, version 7.2.1.

Les séquences d'ADN de la présente étude ont été soumises au GenBank du NCBI (Centre national d'information biotechnologique, USA) et déposées dans cette base de données sous les numéros d'accès : **MT104575** et **MT104576**.

3.4.2.5 Séquence et analyse phylogénétique

Les séquences nucléotidiques et les séquences d'acides aminés déduites (aa) ont été alignées sur celles des souches de référence de l'IBDV provenant de GenBank (énumérées dans le Tableau 3.2). La méthode Clustal W a été utilisée pour effectuer des alignements multiples en utilisant l'analyse génétique moléculaire évolutive (MEGA) version 7.

L'analyse phylogénétique basée sur les séquences nucléotidiques du domaine hypervariable de VP2 des souches virales de l'étude a été réalisée en construisant un arbre phylogénétique grâce au logiciel Mega V7 en choisissant l'algorithme "Neighbor Joining" avec un Bootstrap de 1000 réplifications.

L'objectif de l'analyse phylogénétique était de déterminer la relation entre les deux souches algériennes isolées lors de la présente étude et les souches de référence de l'IBDV, notamment les souches de référence classiques, atténuées/vaccinées, hypervirulentes (= vv), et variantes, d'Algérie et de diverses autres parties du monde, comme présenté dans le Tableau 3.2.

Tableau 3.2 Souches de référence de l'IBDV utilisées en comparaison avec les souches de la présente étude

No	IBDV Strains	Virulence	Origin and year	GenBank accession number	IBDV segment
1	Faragher 52-70	Classic	England	Y14958	VP2 (segment A)
2	STC	Classic	USA	D00499	Segment A of IBVD
3	Cu-1 M	Attenuated/vaccine	Germany	AF362771	
4	Bursa Vac	Attenuated/vaccine		AF498633	VP2 (Segment A)
5	Cloned D78	Attenuated/vaccine	NOBILIS (1997)	Y14962	VP2 (Segment A)
6	Cevac IBDL	Attenuated/vaccine	CEVA (2008)	EU544157	VP2 (Segment A)
7	150124	vvIBDV/reassortant	Algeria (2018)	KY555572	VP2 (Segment A)
8	150128	vvIBDV	Algeria (2018)	KY555578.1	VP2 (Segment A)
9	150133	vvIBDV	Algeria (2018)	KY555586.1	VP2 (Segment A)
10	150142	vvIBDV/reassortant	Algeria (2018)	KY555594	VP2 (Segment A)
11	150144	vvIBDV/reassortant	Algeria (2018)	KY555598	VP2 (Segment A)
12	03ALG	vvIBDV	Algeria (2015)	KP729478	VP2 (Segment A)
13	09ALG	vvIBDV	Algeria (2015)	KP729479	VP2 (Segment A)
14	20ALG	vvIBDV	Algeria (2015)	KP729480	VP2 (Segment A)
15	38ALG	vvIBDV	Algeria (2015)	KP729481	VP2 (Segment A)
16	50ALG	vvIBDV	Algeria (2015)	KP729482	VP2 (Segment A)
17	399 Algeria	vvIBDV	Algeria (2017)	MF142528	VP2 (Segment A)

18	P07	vvIBDV	Tunisia	AY665672	Segment A
19	UK661	vvIBDV	England (1989)	X92760	VP2 (segment A)
20	D6948	vvIBDV	Netherland (1989)	AF240686	Segment A
21	849VB	vvIBDV	Belgium (1989)	AY321949	Segment A
22	89163	vvIBDV	France	HG974563	Segment A
23	OKYM	vvIBDV	Japan (1991)	D49706	Segment A
24	HK46	vvIBDV	Hong Kong (1994)	AF092943	Segment A
25	E/Delaware	Variant	USA (1985)	AF133904	Segment A
26	GLS	Variant	USA (1987)	M97346	Segment A
27	OH	Serotype 2	USA (1982)	M66722	Non-pathogenic (Segment A)
28	MBechIBDVdz1	To be determined	Algeria (present study)	MT104575	VP2 (Segment A)
29	MBechIBDVdz2	To be determined	Algeria (present study)	MT104576	VP2 (Segment A)

3.5 Résultats

3.5.1 Signes cliniques

La maladie est apparue soudainement, accompagnée de mortalités et s'est rapidement propagée dans les cheptels infectés. L'âge lors de l'épidémie était de 21 à 30 jours pour l'ensemble des sujets étudiés. Les taux de mortalité dans les bâtiments de poulets de chair cliniquement affectés se situaient entre 2% et 9%. Une très forte mortalité a été rapportée dans les bâtiments de poulettes N°10 et 11 (71% et 47,8%, respectivement). Les signes cliniques observés étaient l'anorexie, la diarrhée aqueuse blanchâtre, la dépression, les plumes ébouriffées, le regroupement, la somnolence et la mort.

Les signes cliniques observés chez les poulets de chair étaient similaires à ceux observés chez les poulettes, sauf que la maladie s'accompagnait d'une très forte mortalité chez ces dernières.

3.5.2 Lésions nécropsiques et histopathologiques

Les lésions macroscopiques des muscles et de la bourse de Fabricius (BF) des oiseaux affectés sont présentées dans le Tableau 3.3 et illustrées sur la Figure 3.5

Tableau 3.3 Lésions macroscopiques et histopathologiques

Numéro du cheptel	Taux de mortalité (%)	Lésions macroscopiques	Lésions histopathologiques de la bourse de la Fabricius (BF)
1; 2; 3.	6,2; 8 et 4,5 respectivement	BF Hypertrophiée et oedémateuse (Fig. 3.6 B) Haemorragie au niveau des muscles (Figure 3.6 A)	Dépletion lymphocytaire importante Œdème interstitiel et afflux d'hétérophiles et de macrophages (Figure 3.8).
4	2,2	0	Aspect normal de la BF (Figure 3.7).
5; 6; 7; 8; 9.	3; 9; 4,6; 3,9 et 1,8 respectivement	BF Hypertrophiée et oedémateuse Haemorragie au niveau des muscles	Déplétion lymphocytaire folliculaire. Infiltration interstitielle massive d'hétérophiles. Lymphocytes apoptotiques et dégénérés. Infiltration de macrophages et d'hétérophiles. Œdème interstitiel. (Fig. 3.9).
10	<u>71</u>	BF Hypertrophiée et oedémateuse Hémorragies sévères des muscles pectoraux et des cuisses.	Déplétion extensive des lymphocytes avec foyers nécrotiques à coloration dense. Œdème interstitiel et hyperplasie marqués. Epithélium réactif et hyperplasique. Foyer nécrotique composé de macrophages et de débris cellulaires.
11	<u>47,8</u>		Cellules inflammatoires interstitielles. (Figure 3.10). Pâleur marquée, déplétion lymphocytaire et œdème, épithélium réactif et extensivement hyperplasique. (Figure 3.11).

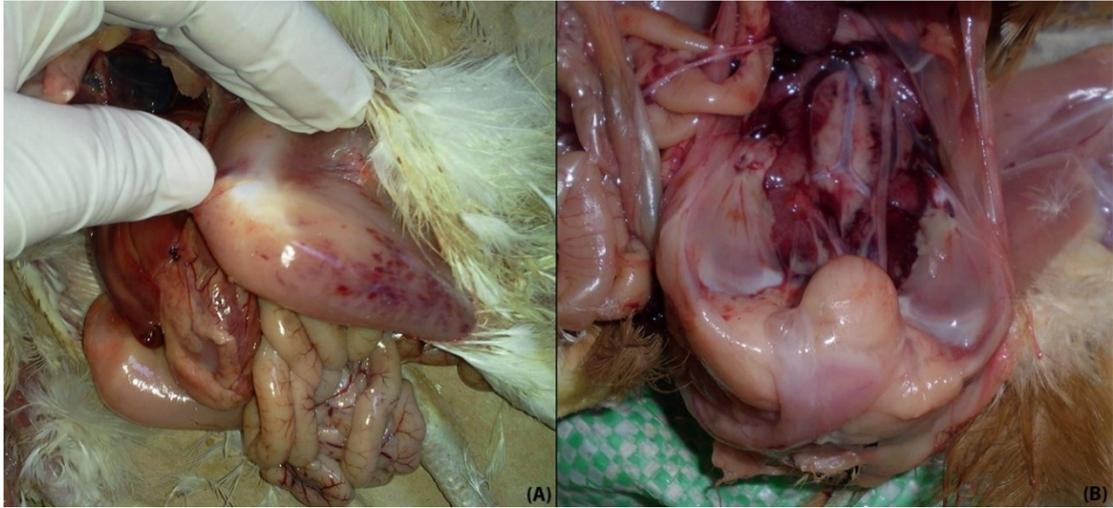


Figure 3.6 Lésions macroscopiques chez des oiseaux suspectés de maladie de Gumboro (IBD). (A) : Hémorragies musculaires (cuisse). (B) : Bourse de Fabricius enflée et œdémateuse (p.perso)

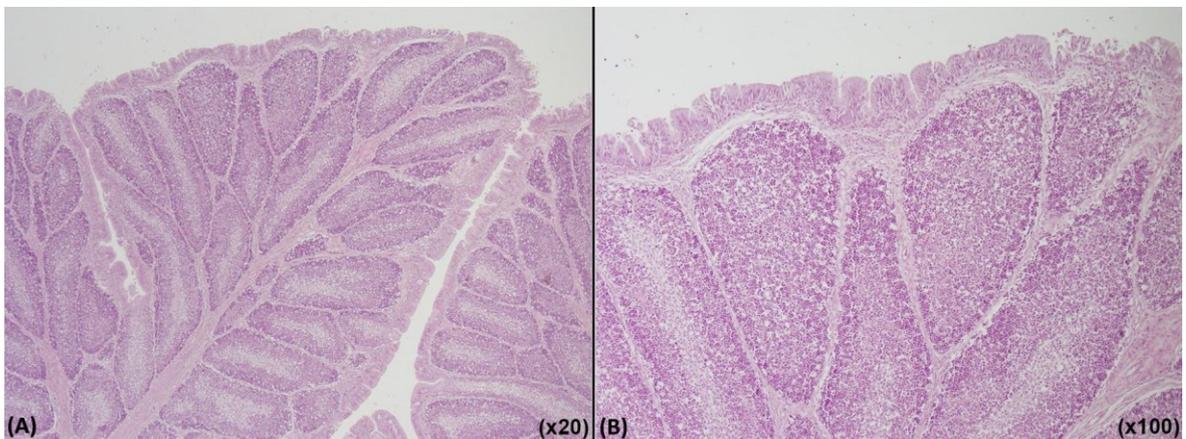


Figure 3.7 (A) : BF normale avec des cortex externes densément peuplés de lymphocytes et des médullaires peu peuplées. Lobules subdivisés par du tissu conjonctif. Surface luminale recouverte d'un épithélium prismaïque pseudostratifié (H&E, 20x). (B) : BF normale, identique avec celle à gauche (H&E, 100x) (Photo personnelle)

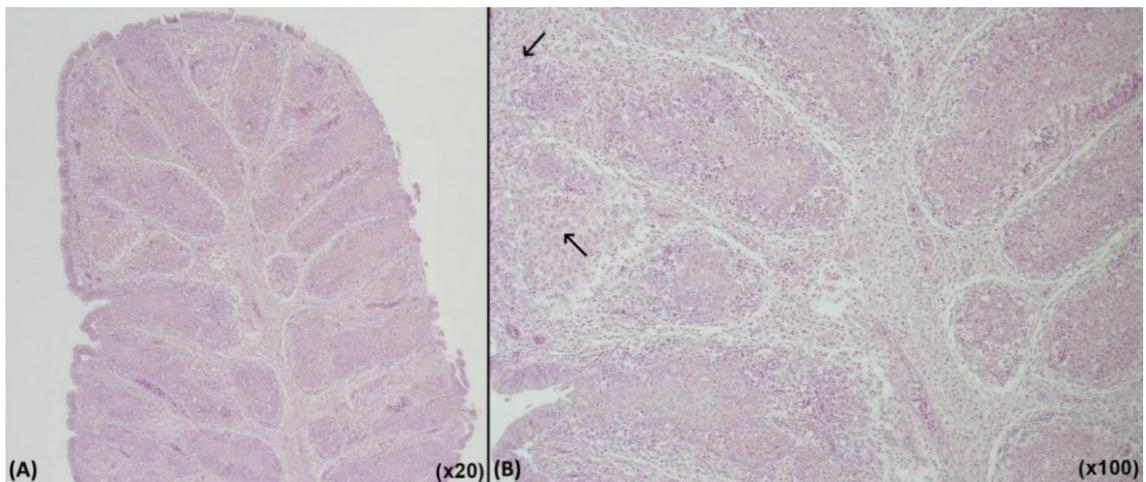


Figure 3.8 (A) : Pâleur marquée due à une déplétion extensive des lymphocytes. Structure, architecture et épithélium normaux (H&E, 20x). (B) : Déplétion extensive des lymphocytes de la bourse de Fabricius (flèches). Œdème interstitiel et afflux d'hétérophiles et de macrophages (H&E, 100x) (Photo personnelle).

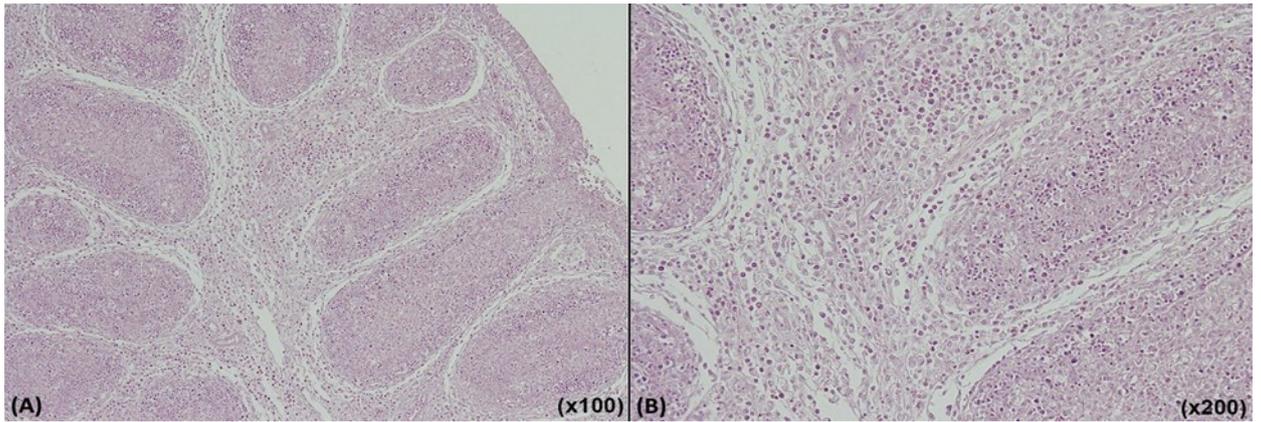


Figure 3.9 (A) : Déplétion lymphocytaire folliculaire dans la bourse de Fabricius. Infiltration interstitielle extensive d'hétérophiles (H&E, 100x). (B) : Lymphocytes apoptotiques et dégénérés. Infiltration de macrophages et d'hétérophiles. Œdème interstitiel (H&E, 200x) (Photo personnelle).

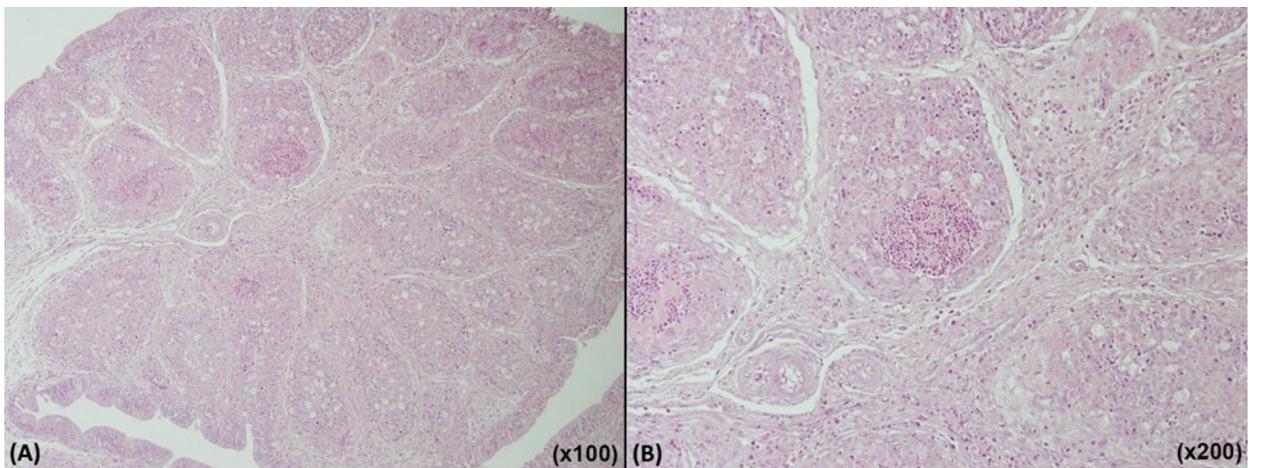


Figure 3.10 (A) : Déplétion lymphocytaire étendue avec foyers nécrotiques à coloration intense dans la bourse de Fabricius. Œdème interstitiel et hyperplasie marqués. L'épithélium est réactif et hyperplasique (H&E, 100x). (B) : Foyer nécrotique constitué de macrophages et de débris cellulaires. Cellules inflammatoires interstitielles (H&E, 200x) (Photo personnelle).

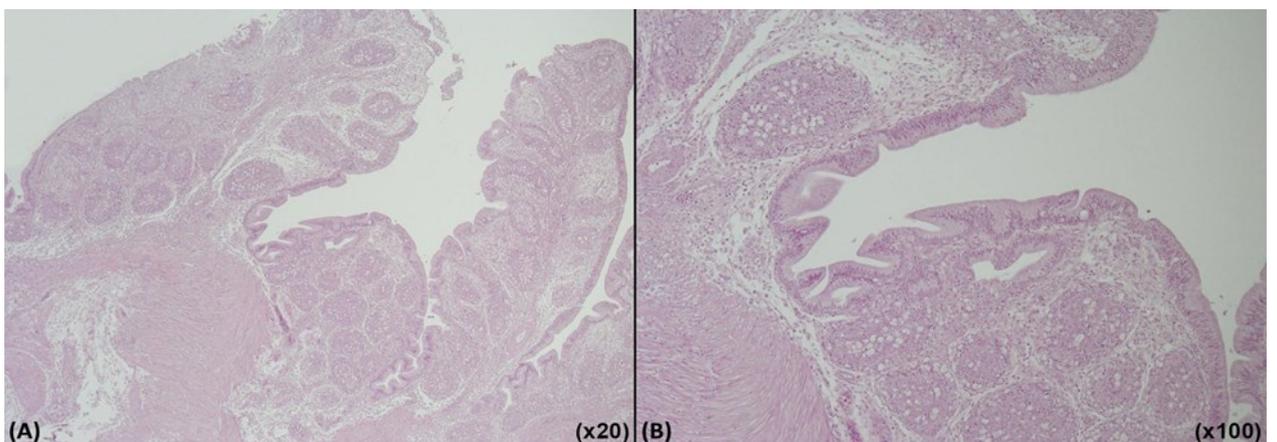


Figure 3.11 Pâleur marquée, déplétion lymphocytaire et œdème dans la bourse de Fabricius. Épithélium réactif et extensivement hyperplasique. (A) : H&E, 20x ; (B) : H&E, 100x (Photo personnelle).

Les principales lésions macroscopiques se résumaient à une bourse de Fabricius hypertrophiée et œdémateuse et des hémorragies sévères au niveau des muscles pectoraux et des cuisses (voir tableau 3.3 et figure 3.6)

Concernant les lésions histopathologiques observées dans la bourse de Fabricius, celles qui étaient communes à presque tous les sujets (exception faite pour le cheptel N°4) se résumaient à une déplétion lymphocytaire, un œdème interstitiel et une infiltration de macrophages et d'hétérophiles (tableau 3.3 et figures 3.8, 3.9, 3.10 et 3.11). La déplétion lymphocytaire indique une nécrose comme mentionné pour le cheptel N°10 dans le tableau ci-dessus par la description "déplétion extensive des lymphocytes avec foyers nécrotiques" (Figure 3.10) et comme implicitement citée pour le cheptel N°11 par la description "pâleur marquée" (même tableau 3.3 figure 3.11).

Par ailleurs, cette déplétion lymphocytaire indique une apoptose pour les sujets issus des élevages N° 5, 6, 7, 8 et 9, comme mentionné dans le tableau 3.3 par la description "lymphocytes apoptotiques et dégénérés" (Figure 3.9). Pour ce qui est des autres lésions: œdème interstitiel et infiltration de macrophages et d'hétérophiles, elles sont indicatrices d'un état inflammatoire.

3.5.3 Caractérisation moléculaire

3.5.3.1 RT-PCR

En utilisant la RT-PCR, l'IBDV a été détecté dans 6 des 11 élevages avicoles étudiés (54,5 %), à savoir les cheptels N°1, 2, 3, 9, 10 et 11. L'ARN viral extrait de la carte FTA® a montré une amplification spécifique du gène VP2 d'une taille de 422 pb. La spécificité de la RT-PCR a été confirmée par l'absence d'amplification dans le contrôle négatif.

3.5.3.2 Alignement nucléotidique

Les séquences nucléotidiques obtenues pour les 2 souches, ont été comparées, grâce à un alignement multiple, à celles d'autres pathotypes de référence (figure 3.12).

L'alignement multiple de séquences dressé ci-dessous révèle les changements de nucléotides au sein de chaque souche virale et permet d'identifier les nucléotides que partagent les 2 souches de l'étude avec chacun des 4 pathotypes de l'IBDV (Classiques, atténués, hypervirulents et variants).

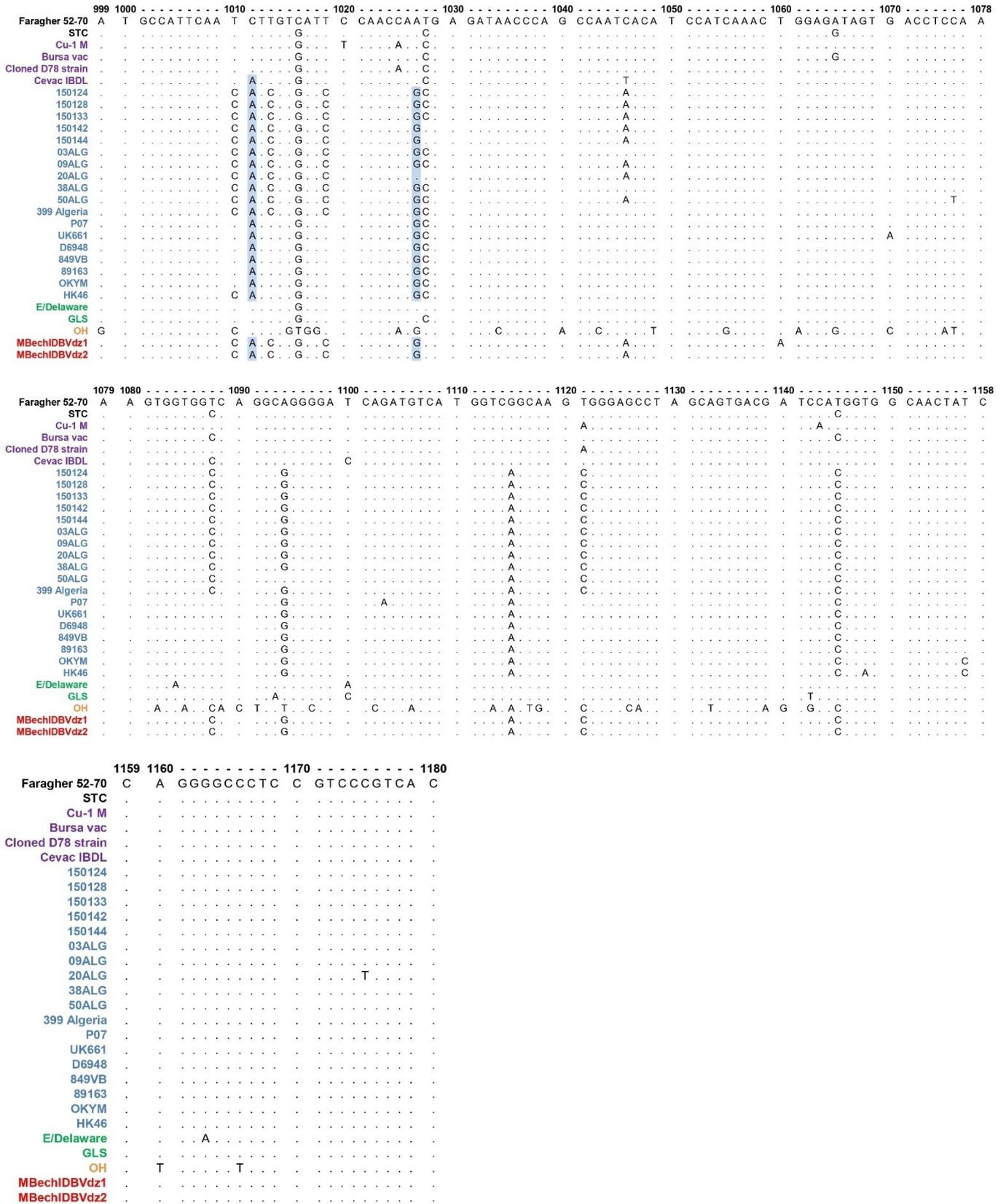


Figure 3.12 Alignement multiple des séquences nucléotidiques (selon la numérotation de Bayliss et al., 1990), permettant de comparer les souches de l'étude (en rouge) avec les souches classiques (en noir), les souches vaccinales (en violet), les souches hypervirulentes (en bleu), les souches variantes (en vert) ainsi que le virus apathogène OH (en orange).

Il convient de signaler que le point sous la lettre, dans le tableau ci-dessus, indique que la base dans la souche virale est la même que celle retrouvée dans la souche 52/70 à la même position. Par contre, la lettre indique un changement de base dans la souche virale par rapport à celle retrouvée dans la souche 52/70 à la même position.

Les 2 souches de l'étude ont en commun avec les virus virulents (classiques et hypervirulents) le nucléotide "G" en position 966 et 981 (figure 3.12), ce qui les distingue des virus atténués (vaccins) et variants [26].

Les virus de l'étude partagent des substitutions non synonymes (= mutations génétiques engendrant un changement de l'acide aminé encodé) avec les virus hypervirulents. Il s'agit des mutations 795(C→G), 897(G→A), 1011(C→A) et 1027 (A→G), comme l'illustre la figure ci-dessus (ces mutations sont surlignées en bleu sur la même figure). Les changements en acides aminés correspondant à ces mutations sont comme suit : 222 (P→A), 256 (V→I), 294 (L→I) et 299 (N→S), comme le montre la figure 3.12 relative à l'alignement des acides aminés.

A signaler aussi que les souches du présent travail et les virus hypervirulents partagent de façon distinctive des substitutions silencieuses (= mutations génétiques n'entraînant pas un changement de l'acide aminé encodé) et ce en positions 827, 830, 866, 905, 908, 977, 989, 1094, 1115 et 1145 (voir figure 3.12).

3.5.3.3 Analyse des séquences d'acides aminés déduites des séquences nucléotidiques

Deux des six échantillons positifs au test RT-PCR ont été sélectionnés pour le séquençage. Les deux séquences nucléotidiques (MBechIBDVdz1 et MBechIBDVdz2) de la présente étude ont été alignées et leurs séquences d'acides aminés déduites aux positions 211-350 ont été comparées à la région hypervariable VP2 de 27 isolats mondiaux de l'IBDV, virulents et atténués, incluant 11 IBDV algériens et le sérotype 2 de l'IBDV disponibles dans la base de données NCBI. La figure 3.13 illustre cette comparaison.

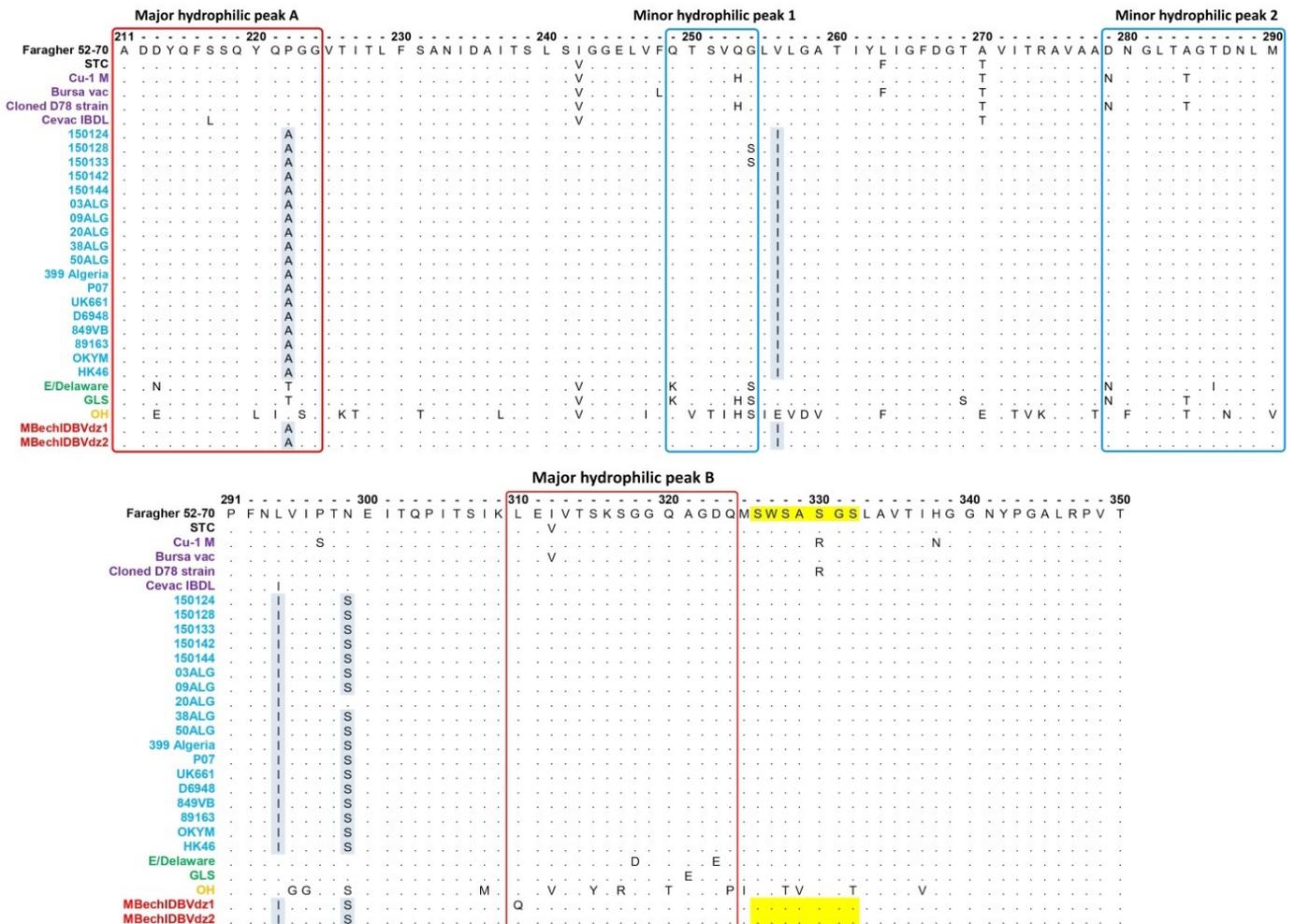


Figure 3.13 Alignement des séquences d'acides aminés déduites de la région hypervariable VP2 des souches d'IBDV, aux positions 211-350. Les points indiquent les positions avec des acides aminés identiques à la souche de référence Faragher 52-70. Les pics hydrophiles majeurs sont encadrés en rouge et les pics hydrophiles mineurs sont encadrés en bleu. Les positions des acides aminés sont conformes à celles de Bayliss et al. (1990). Les positions 222 (A), 256 (I), 294 (I), et 299 (S) des acides aminés sont caractéristiques des vvIBDV. L'heptapeptide 'SWSASGS', une zone riche en sérine (encadrée en jaune), est indicative des souches virulentes d'IBD.

Les souches de la présente étude (MBechIBDVdz1 et MBechIBDVdz2) ont subi des substitutions génétiques qui ont abouti à la présence des acides aminés Alanine, Isoleucine et Sérine dans les positions suivantes (222A, 256I, 294I et 299S), comme le montre la figure ci-dessus, présence qui est caractéristique du pathotype hypervirulent selon des études précédentes [217] [120].

De plus, le phénotype virulent de nos souches algériennes a été déterminé par la co-existence des acides aminés 279D et 284A, comme rapporté dans des études précédentes [218] [219] [49].

La Figure ci-dessus montre aussi que les deux souches du présent travail avaient la séquence heptapeptide riche en sérine ‘326SWSASGS332’ adjacente à la deuxième région hydrophile majeure, ce qui est considéré comme un marqueur des souches virulentes de l'IBD, comme rapporté précédemment par Brown et Skinner [217], Hernández et al. [123] et Alkhalefa et al. [125].

Les différentes substitutions sont résumées dans le tableau suivant (3.4) :

Tableau 3.4 Comparaison entre les caractéristiques des résidus d’acides aminés des souches de la présente étude avec celles des souches de référence du virus de l’IBD.

	Amino acid position (as per Bayliss et al., 1990)									
	222	249	253	254	256	279	284	294	299	330
Classical strains (Faragher 52-70).	P	Q	Q	G	V	D	A	L	N	S
Attenuated/vaccine strains (Cu-1 M, Bursa Vac, D 78, IBDL).	P	Q	Q1 H2	G	V	N2 D1	T2 A1	L	N	R2 S1
vvIBDV strains (Algerian vvIBDV strains (Boudaoud, 2015; Abed et al, 2018) and other vvIDV (UK661, 849VB, 89163, OKYM...)).	A	Q	Q	G	I	D	A	I	S	S
Variant strains (E Delaware, GLS).	T	K	Q3 H4	S	V	N	A3 T4	L	N	S
Strains of present study (MBechIBDVdz1, MBechIBDVdz2).	A	Q	Q	G	I	D	A	I	S	S
1 Bursa Vac; IBDL	2 Cu-1 M; D78		3 E Delaware			4 GLS				

3.5.3.4 Pourcentage de l’identité nucléotidique

L'analyse des séquences a consisté en une comparaison de l'identité nucléotidique (génétique) des souches étudiées avec celle des souches de référence de l'IBDV. Pour calculer l'identité et la similarité des séquences par paires (deux à deux) à partir des alignements multiples, l'outil SIAS (Sequence Identity And Similarity) a été utilisé. Les résultats détaillés sont présentés dans le tableau 3.5:

Tableau 3.5 Pourcentage d'identité nucléotidique entre les souches de la présente étude et certaines souches de référence du virus de la bursite infectieuse (IBDV).

No	IBDV Strains	Virulence	Origin and year	Identity percentage between strains of the present study and selected IBDV strains	
				MBechIBDVd1	MBechIBDVd2
1	Faragher 52-70	Classic	England	93.79	94.03
2	STC	Classic	USA	93.07	93.31
3	Cu-1 M	Attenuated/vaccine	Allemagne	91.40	91.64
4	Bursa Vac	Attenuated/vaccine		93.07	93.31
5	Cloned strain D78	Attenuated/vaccine	NOBILIS(1997)	91.88	92.12
6	Cevac IBDL	Attenuated/vaccine	CEVA (2008)	93.07	93.31
7	150124	vvIBDV	Algeria (2018)	99.28	99.52

8	150128	vvIBDV	Algeria (2018)	98.32	98.56
9	150133	vvIBDV	Algeria (2018)	98.56	98.8
10	150142	vvIBDV/Reassortant	Algeria (2018)	99.76	100
11	150144	vvIBDV/Reassortant	Algeria (2018)	99.76	100
12	03ALG	vvIBDV	Algeria (2015)	98.8	99.04
13	09ALG	vvIBDV	Algeria (2015)	98.8	99.04
14	20ALG	vvIBDV	Algeria (2015)	99.04	99.28
15	38ALG	vvIBDV	Algeria (2015)	98.32	98.56
16	50ALG	vvIBDV	Algeria (2015)	98.8	99.04
17	399_Algeria	vvIBDV	Algeria (2017)	98.8	99.04
18	P07	vvIBDV	Tunisia	96.89	97.13
19	UK661	vvIBDV	England (1989)	96.42	96.65
20	D6948	vvIBDV	Netherland (1989)	97.13	97.37
21	849VB	vvIBDV	Belgium (1989)	97.13	97.37
22	89163	vvIBDV	France	96.89	97.13
23	OKYM	vvIBDV	Japan (1991)	96.65	96.89
24	HK46	vvIBDV	Hong Kong (1994)	96.89	97.13
25	E/Delaware	Variant	USA (1985)	91.64	91.88
26	GLS	Variant	USA (1987)	90.93	91.16
27	OH	Serotype 2	USA (1982)	72.31	72.55

N.B: nucleic acid identity percentage between MBechIBDVdz1 and MBechIBDVdz2 is 99.76%

Dans la présente étude, l'identité nucléotidique entre les deux souches étudiées et les virus du sérotype 1, notamment les virus classiques, atténués, variants et hypervirulents, a connu une notable variation. Elle était relativement plus faible avec les virus classiques, atténués et variants (allant de 90,93 % à 94,03 %), et plus élevée avec les virus hypervirulents (allant de 97 % à 100 %), comme présenté dans le tableau ci-dessus.

Par ailleurs, le pourcentage d'identité nucléotidique le plus bas a été enregistré avec la souche OH, sérotype 2 (apathogène), qui a montré des valeurs de 72,31 % et 72,55 % (Tableau 3.5).

Les souches de la présente étude partageaient un haut degré de similarité (allant de 98,32 % à 99,28 %) avec les souches hypervirulentes algériennes identifiées par Boudaoud en 2015 [26] (03Alg, 09Alg, 20Alg, 38Alg et 50Alg) et la souche 399_Alger [220]. Elles ont également présenté un très haut niveau de similarité (allant de 99,28 % à 100 %) avec les souches hypervirulentes et réassortantes étudiées en Algérie en 2018 par Abed et al. [27] (150124, 150128, 150133, 150142 et 150144), comme le montre le tableau 3.5. Enfin, les souches du présent travail partageaient entre elles un taux de similarité très élevé (99,76%) car elles provenaient de sites très mitoyens et dont les échantillons étaient prélevés dans la même période.

3.5.3.5 Analyse phylogénétique

Le but de l'analyse était de préciser les liens de parenté que pourraient avoir les deux souches de l'étude avec les virus de référence appartenant aux différents pathotypes de diverses origines géographiques (voir tableau 3.2).

Le résultat de l'analyse est visualisé sous forme d'arbres phylogénétiques ou phylogrammes, construits à partir d'un alignement multiple de séquences de nucléotides, comme illustré sur la figure 3.14.

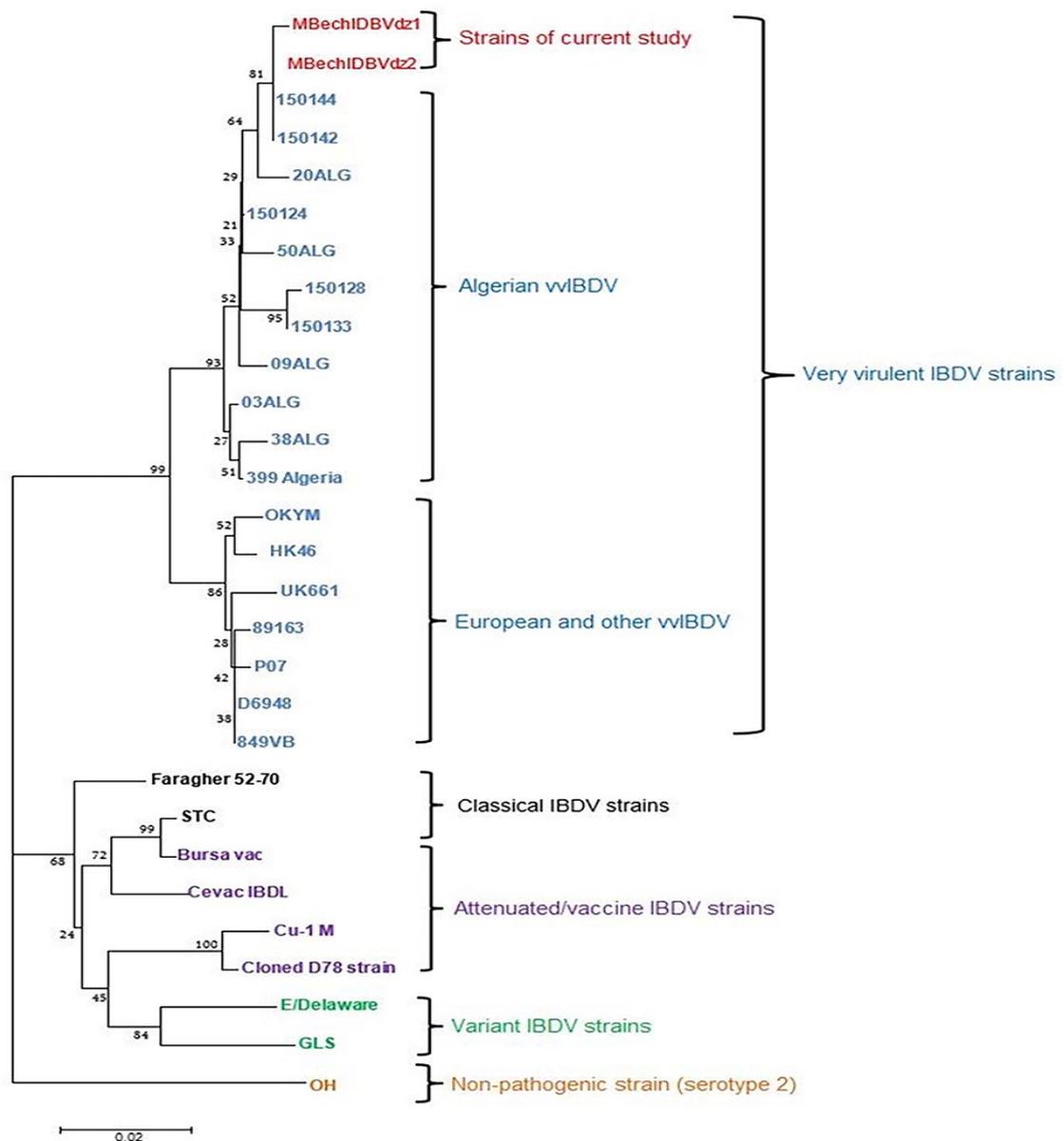


Figure 3.14 Arbre phylogénétique basé sur le séquençage partiel du gène VP2, montrant la relation entre les deux souches algériennes isolées dans la présente étude et d'autres souches de référence de l'IBDV, d'Algérie et de diverses autres parties du monde (souches de référence classiques, atténuées/vaccinales, vv et variantes de l'IBDV).

L'analyse phylogénétique des séquences nucléotidiques indique un regroupement des IBDV en fonction de leur virulence et de leur localisation géographique. Les IBDV classiques, atténués/vaccinaux et variants forment un clade distinct des vvIBDV.

Selon l'arbre phylogénétique (Figure 3.13), les deux souches examinées dans la présente étude (MBechIBDVdz1 et MBechIBDVdz2) sont étroitement liées aux souches hypervirulentes (vvIBDV) algériennes isolées antérieurement, car elles sont regroupées ensemble.

3.6 Discussion

Cette étude avait pour objectif d'examiner la persistance du pathotype hypervirulent de l'IBDV (vvIBDV) dans certaines régions de l'Algérie en procédant à une caractérisation moléculaire des souches en circulation. Elle visait également à établir des liens entre les virus identifiés et les souches de référence d'IBDV en Algérie ainsi qu'à l'échelle internationale. De plus, un examen histopathologique de la bourse de Fabricius des oiseaux étudiés a été réalisé pour évaluer l'impact de ces souches virales sur cet organe.

L'IBD, connue pour son effet immunosuppresseur sur les jeunes poulets, a causé des pertes financières significatives dans l'industrie avicole mondiale, en particulier au cours de la dernière décennie [146].

Pour contrôler l'infection par l'IBDV, les poussins chair et les poulettes sont immunisés avec des souches vaccinales intermédiaires ou intermédiaires-plus, tandis que les reproducteurs reçoivent des vaccins vivants atténués et inactivés [221].

Malgré des mesures de biosécurité strictes et des programmes de vaccination intensifs, des épidémies d'IBD continuent de se produire dans le monde entier [4]. Ceci pourrait être dû à des mutations génétiques fréquentes, à la recombinaison génomique et au réassortiment du génome viral, qui pourraient à leur tour entraîner un échec vaccinal [222].

Le changement soudain du tableau clinique de l'IBD dans différentes régions d'Algérie, caractérisé par des taux de mortalité nettement plus élevés par rapport à la forme classique, a suscité l'hypothèse que des souches hypervirulentes pourraient s'être propagées en raison de mutations génétiques au sein du génome de l'IBDV.

Les taux de mortalité observés dans les lots de poulettes affectés par la souche vvIBDV de la présente étude correspondent aux taux précédemment documentés dans la littérature, comme rapporté par Berg [16], Eterradosi et Saif [17] et Shekhar et Dalai [223]. Des recherches ont montré que les volailles de type pondeuse, ou poulettes, sont plus vulnérables au vvIBDV que les poulets de type chair, comme l'ont noté Silva et al. [224] et Shekhar et Dalai [223]. De plus, il a été constaté que les poulettes d'un des élevages du présent travail (où on a pu enregistrer le taux de mortalité le plus élevé) n'étaient pas vaccinées contre l'IBD (élevage N°10).

Il est important de souligner que malgré que le cheptel N°11 ait été vacciné contre l'IBD, il a tout de même contracté le virus. Cela pourrait être attribué à un échec vaccinal en raison

d'une inadéquation entre la souche virale circulante, qui dans ce cas était la souche hypervirulente (vvIBDV), et la souche vaccinale qui a été administrée, qui était une souche intermédiaire. Dans le même contexte, la littérature a révélé que les souches vaccinales Gumboro "douces" ou même intermédiaires ne sont pas très efficaces contre le pathotype hypervirulent, comme l'ont rapporté certains auteurs [21]. En effet, la caractéristique des vvIBDV est leur capacité à provoquer la maladie même en présence de niveaux élevés d'anticorps d'origine maternelle (AOM ou MDAs) [16] [225].

Les mortalités modérées enregistrées dans quelques élevages de poulets de chair de la présente étude pourraient suggérer qu'ils ont été infectés par une souche classique d'IBDV. Dans le même contexte, il a été rapporté que la mortalité associée à l'infection due aux souches classiques peut varier de 1 à 30 % [7] [13]. En revanche, la souche variante ne peut pas être impliquée dans les cas de la présente recherche car elle ne produit pas de signes cliniques apparents, mais cause une immunosuppression et peut entraîner une mortalité due à des infections opportunistes secondaires [144].

D'autre part, l'âge au moment du déclenchement des foyers de Gumboro concordait avec les données rapportées dans la littérature. La maladie clinique résultant d'une infection par le vvIBDV est généralement observée chez les poussins âgés de 3 à 6 semaines, ce qui coïncide avec la période de développement maximal de la bourse de Fabricius (BF). Ceci est également observé avec les souches pathogènes classiques, selon Mahgoub et al. [49].

Les principales lésions macroscopiques observées au cours du présent travail se résument à une bourse de Fabricius hypertrophiée et œdémateuse et des hémorragies sévères au niveau des muscles pectoraux et des cuisses. Ces résultats convergent avec ceux rapportés par Khenenou et al. [226] et Umm-i-Habiba et al. [227]. Lors de l'examen post-mortem, la bourse de Fabricius est l'organe principal pour diagnostiquer les oiseaux morts pendant la phase aiguë du vvIBD. Au niveau macroscopique, la bourse de Fabricius apparaît gonflée, œdémateuse et parfois hémorragique. En 7 à 10 jours, la bourse de Fabricius devient atrophiée, comme l'a noté Ingraio et al. [151].

Aucune atrophie de la BF n'a été trouvée dans la présente étude, ce qui indique que la maladie avait commencé récemment, car l'atrophie de la bourse n'est détectée que dans les cas avancés d'IBD [228]. Selon Bejo et al. [229], la bourse de Fabricius subit une atrophie en raison de la progression de la dégénérescence et de la nécrose des cellules lymphoïdes au stade avancé de l'infection.

Les découvertes post-mortem ne diffèrent pas de manière significative entre les infections par le vvIBDV et les souches virulentes classiques, telles que F52/70, sauf que les hémorragies dans la BF et d'autres tissus peuvent être plus étendues et fréquentes dans les infections par le vvIBDV. De plus, la maladie peut être plus prononcée, aiguë et associée à une mortalité élevée [185] [151].

Les lésions histopathologiques observées dans la bourse de Fabricius lors de la présente étude se résumaient à une déplétion lymphocytaire, un œdème interstitiel et une infiltration de macrophages et d'hétérophiles. Ces altérations indiquent trois principales lésions sous-jacentes : la nécrose et l'apoptose (pour la déplétion lymphocytaire) et l'état inflammatoire (pour l'œdème interstitiel et l'infiltration de macrophages et d'hétérophiles).

Ces modifications microscopiques sont cohérentes avec les données bibliographiques sur l'infection par le vvIBDV [230] [165]. La déplétion des cellules lymphoïdes B dans la bourse de Fabricius après une infection par l'IBDV est attribuée à la fois à la nécrose et à l'apoptose, comme l'ont souligné Rodriguez-Lecompte et al. [231] et Ingraio et al. [151]. Selon ces auteurs, l'apoptose intervient en premier puis s'ensuit la nécrose en dernier. Le moment de l'infection déterminerait la cause de l'apoptose. Au début de l'infection, l'apoptose serait un mécanisme de défense de l'organisme pour se prévenir de la propagation du virus. Plus tard, l'apoptose cellulaire est l'effet de la réplication virale massive [232].

Cependant, certains auteurs affirment que le génome de certains virus code pour la synthèse de protéines qui retardent la mort par apoptose de la cellule infectée, pour éviter ainsi l'échec de l'infection. Ces protéines ont d'abord pour rôle d'inhiber l'apoptose de la cellule [63], puis d'initier ce processus à la fin de l'infection afin de faciliter la libération des virions et de favoriser la dissémination du virus [233] [234]. Dans le cas du virus de la Gumboro, l'effet anti-apoptotique durant les phases précoces de l'infection serait exercé par la protéine non structurale VP5 qui prévient la mort de la cellule infectée jusqu'au terme du cycle viral [62] [63].

En résumé, la nécrose et l'apoptose vont contribuer à une régression rapide des follicules bursiques. Ces atteintes des cellules immunitaires de la BF (surtout les lymphocytes B) amèneraient à une immunosuppression chez le poulet [106].

La bourse de Fabricius est le tissu privilégié pour évaluer les changements microscopiques. De plus, la littérature n'indique pas de différence significative entre les lésions histologiques de la BF causées par les IBDV hypervirulents et classiques [185].

Selon Lukert et Saif [28] et Mahgoub et al. [49], la dégénérescence et la nécrose des lymphocytes commencent dans la zone médullaire des follicules boursiers dès 1 jour post-infection (jpi). Ensuite, les lymphocytes sont remplacés par des hétérophiles, des débris pycnotiques et des cellules réticuloendothéliales hyperplasiques. Selon les mêmes auteurs, dans 3 ou 4 jours post-infection, tous les follicules lymphoïdes sont touchés. Un œdème sévère, une hyperhémie et une accumulation marquée d'hétérophiles sont observés, ce qui entraîne une augmentation du poids de la BF.

Selon Ignjatovic [185], les poussins infectés par des souches classiques de l'IBDV ayant une faible pathogénicité montrent une régénération de la BF, caractérisée par le repeuplement des lymphocytes, dans les 8 à 21 jours suivant l'infection. En revanche, les poussins infectés par le vvIBDV ne présentent pas de phase de récupération, et des lésions chroniques se développent dans leur bourse trois semaines après l'infection.

En utilisant la RT-PCR, l'IBDV a été détecté dans 54,5 % des troupeaux de poulets étudiés. Ce taux est cohérent avec les résultats rapportés par Boudaoud en 2015 (46,15 %) [26] et Abed et al. en 2018 (63 %) [27].

Le gène VP2 est fréquemment utilisé pour détecter l'IBDV par la méthode RT-PCR en raison de sa grande spécificité, et, par conséquent, il est couramment utilisé par les chercheurs pour différencier et classifier les isolats d'IBDV [235] [236] [237]. De plus, il est connu que la protéine VP2 joue un rôle crucial dans la pathogénicité, la virulence et le tropisme du virus, comme l'ont noté Cheggag et al. [45].

La région hypervariable VP2, s'étendant des acides aminés 206 à 350, contient deux domaines hydrophiles majeurs appelés pics hydrophiles A (acides aminés 212-224) et B (acides aminés 314-325), qui forment respectivement les boucles en épingle à cheveux PBC (acides aminés 219-224) et PHI (acides aminés 316-324) [46] [47] [48] [49]. Les pics hydrophiles mineurs 1 (aa 248-254) et 2 (aa 279-290) de VP2 forment respectivement les boucles PDE (aa 249-254) et PFG (aa 279-284) [50].

L'alignement nucléotidique a révélé que les 2 souches de la présente étude ont en commun avec les virus virulents (classiques et hypervirulents) le nucléotide "G" en position 966 et

981, ce qui les distingue des virus atténués (vaccins) et variants, comme cela a été rapporté par la bibliographie [26].

Aussi, les souches du présent travail et les virus hypervirulents partagent de façon distinctive des substitutions silencieuses (= mutations génétiques n'entraînant pas un changement de l'acide aminé encodé) et ce en positions 827, 830, 866, 905, 908, 977, 989, 1094, 1115 et 1145 [26].

Dans le même contexte, les virus de la présente étude partagent des substitutions non synonymes (= mutations génétiques engendrant un changement de l'acide aminé encodé) avec les virus hypervirulents. Il s'agit des mutations 795(C→G), 897(G→A), 1011(C→A) et 1027 (A→G). Les changements en acides aminés correspondant à ces mutations sont comme suit : 222 (P→A), 256 (V→I), 294 (L→I) et 299 (N→S), lesquelles sont considérées comme spécifiques des virus hypervirulents [217] [70] [71].

Comme rapporté par d'autres auteurs [118] [119] [120], certains résidus conservés (A222, I242, Q253, I256, D279, A284, I294 et S299) sont considérés comme caractéristiques des vvIBDV. L'analyse des séquences en acides aminés du présent travail, présentée dans le tableau 3.4, corrobore ces conclusions.

De plus, nos séquences ont montré la présence de l'acide aminé Q249, qui a été détecté dans de nombreuses souches de vvIBDV [238]. Les résidus I272, M290, Q324 et S330 trouvés sont également fréquemment observés et distinctifs des souches de vvIBDV, comme indiqué dans des recherches antérieures [123] [27].

Selon des études précédentes [218] [219] [49], la présence des acides aminés 279D et 284A dans nos souches algériennes détermine leur phénotype virulent.

En outre, la glutamine (Q) à la position 253, l'acide aspartique (D) à la position 279, et l'alanine (A) à la position 284 ont été identifiés comme les acides aminés potentiellement responsables de la virulence et du tropisme cellulaire dans plusieurs études [126] [219] [222].

Les deux souches analysées dans cette étude ont été trouvées contenant la séquence heptapeptide 'SWSASGS' riche en sérine (acides aminés 326 à 332), qui est adjacente à la deuxième région hydrophile majeure B (acides aminés 314-325). Cette séquence est couramment associée aux souches virulentes de l'IBD, comme l'ont noté des études antérieures menées par Brown et al. [79], Hernández et al. [123], Felice et al. [124] et Alkhalefa et al. [125]. De plus, Lachheb et al. [238] ont rapporté que les souches les plus

virulentes étaient celles avec la région contenant le plus grand nombre de résidus de sérine. En outre, l'absence de l'aa 249R dans les séquences étudiées, caractéristique des souches atténuées de l'IBDV [19], a confirmé leur phénotype virulent.

Contrairement aux virus variants qui manquent généralement d'aa 222T et 254S, comme l'a noté une étude précédente de Heine et al. [122], ces résidus d'acides aminés étaient présents dans les souches analysées de la présente étude. Cela indique qu'aucune dérive antigénique n'a été observée parmi ces souches. De plus, les souches variantes de l'IBDV sont connues pour provoquer une immunosuppression (due à une atrophie précoce et sévère de la BF) et une réduction des performances de production, même si elles ne causent pas de signes cliniques évidents [144] [184] [239].

Les souches analysées dans la présente recherche se sont avérées très similaires aux souches hypervirulentes algériennes précédemment identifiées par Boudaoud en 2015 [26], à savoir 03Alg, 09Alg, 20Alg, 38Alg et 50Alg, ainsi qu'à la souche 399_Algerie rapportée par Michel et Jackwood en 2017 [220]. De plus, elles étaient presque indiscernables (99,28-100%) des souches hypervirulentes et reassortantes signalées en Algérie en 2018 par Abed et al. (2018) [27], notamment les souches 150124, 150128, 150133, 150142 et 150144.

D'après l'arbre phylogénétique, il a été observé que les deux souches étudiées (MBechIBDVdz1 et MBechIBDVdz2) étaient étroitement liées aux vvIBDV algériennes précédemment isolées, et elles étaient regroupées ensemble dans un même groupe.

Du point de vue chronologique, l'apparition initiale de l'IBD dans la production avicole en Algérie a eu lieu après que le virus ait émergé en Europe à la fin des années 1980, comme l'ont noté Allamigeon et Comte [24]. En 2015, Boudaoud a identifié une souche vvIBDV dans la région de l'Est algérien [26]. Plus récemment, Abed et al. ont mené une étude qui a confirmé la circulation de diverses souches du virus de la Gumboro dans le pays [27]. Basée sur des analyses génétiques de séquences partielles des segments A et B, ces chercheurs ont identifié quatre groupes d'isolats algériens d'IBDV : i) des virus liés au vvIBDV pour les segments A et B ; ii) des virus dont le segment A est lié au vvIBDV et dont le segment B est plus éloigné du vvIBDV ; iii) des virus liés aux souches vaccinales ; et iv) des virus potentiellement reassortis, avec un segment A génétiquement lié au vvIBDV et un segment B d'origine indéterminée.

Concernant l'émergence de souches réassortantes comme noté dans le dernier paragraphe, certains auteurs font la liaison avec une vaccination intensive sans correspondance avec le génotype sauvage circulant, comme l'ont rapporté Pikula et al [240] en Pologne, qui ont constaté l'apparition d'une souche réasortante ayant acquis le segment A de l'IBDV très virulent (vvIBDV) et le segment B de la souche classique atténuée atIBDV D78.

Les souches hypervirulentes ont également été signalées dans des pays voisins de l'Algérie. Selon Cheggag et al. [45], près de 40 % des IBDV en circulation au Maroc entre 2013 et 2016 étaient des souches hautement virulentes. D'après Lachheb et ses collègues [238], leurs recherches sur les souches tunisiennes d'IBDV ont montré que les isolats de ce pays sont étroitement liés aux souches algériennes hypervirulentes, sur la base d'analyses phylogénétiques des séquences de cinq gènes. En revanche, les souches marocaines, malgré leur proximité géographique, se sont révélées moins étroitement liées et n'étaient pas sur la même branche de l'arbre phylogénétique.

Selon Drissi Touzani et al. [241], le segment A des isolats marocains d'IBDV était phylogénétiquement lié aux isolats hypervirulents algériens et tunisiens, probablement en raison de la proximité géographique et des échanges transfrontaliers entre le Maroc et ces pays voisins. Cependant, dans la phylogénie du segment B, les isolats marocains d'IBDV se sont révélés être plus étroitement liés aux isolats français et malaisiens, comme l'ont rapporté les mêmes auteurs.

CONCLUSION, RECOMMANDATIONS ET PERSPECTIVES

La présente étude a été réalisée pour déterminer les caractéristiques moléculaires et les effets histopathologiques du virus de la bursite infectieuse (IBDV) isolé à partir de quelques élevages de poulets de chair et de poulettes dans l'Est et le Centre de l'Algérie. Cinquante-cinq sujets provenant de onze élevages avicoles ont été examinés suite à des suspicions d'IBD sur une période s'étalant de 2019 à 2020.

Exception faite pour le cheptel N° 4, tous les sujets de l'étude ont montré des lésions microscopiques de l'IBD qui se résument à une déplétion lymphocytaire, un œdème interstitiel et une infiltration de macrophages et d'hétérophiles. La RT-PCR a confirmé l'infection par l'IBDV dans les échantillons des élevages N° 1, 2, 3, 9, 10 et 11. Un séquençage a permis de détecter une souche hautement virulente de l'IBDV (vvIBDV) dans les échantillons des élevages N° 10 et 11 où les taux de mortalités enregistrés étaient les plus élevés (71% et 47,8%, respectivement). Les souches identifiées présentaient quatre acides aminés conservés (222A, 256I, 294I et 299S), caractéristiques du vvIBDV. Selon l'arbre phylogénétique, les deux souches de la présente étude étaient étroitement liées aux vvIBDVs isolés les années précédentes dans diverses régions du pays et se regroupaient ensemble.

Notre contribution a permis de constater la persistance de la circulation des souches du pathotype hypervirulent en Algérie, ainsi que les pertes énormes en matière de taux de mortalités qui en résultent, sans oublier l'effet du virus (sous ses deux formes classique et hypervirulente) sur l'intégrité histologique de la bourse de Fabricius, qui est considérée comme un organe vital du système immunitaire des volailles, tout cela en dépit des millions de doses de vaccins contre la Gumboro administrés dans les différents segments de la filière avicole.

Ce constat nous pousse à réfléchir sur les causes de ces échecs vaccinaux contre l'IBD, et que la science vétérinaire a pourtant bien élucidées et a imputé à divers facteurs, notamment l'inadéquation entre la souche vaccinale utilisée et le type de souche virale circulante (souche hypervirulente dans notre cas), cause qui apparaît évidente dans le présent travail. Sans omettre les facteurs liés à la date optimale de vaccination, au mode opératoire vaccinal ou tout

simplement au fait de ne pas vacciner contre cette redoutable pathologie dans certains cas (comme constaté dans l'élevage N° 10 de la présente étude où le taux de mortalité a été le plus élevé).

Au terme de cette étude, les vétérinaires praticiens (surtout chargés du suivi sanitaire des élevages avicoles) doivent être informés par les autorités vétérinaires et les établissements de recherche sur le type de souches "sauvages" de l'IBD qui circulent dans les différentes régions du pays ainsi que sur les causes des échecs vaccinaux enregistrés dans le cadre de la prévention contre cette maladie. En raison du taux de mortalités élevé qu'elles engendrent, une attention particulière doit être portée aux souches hautement virulentes qui continuent de se répandre en Algérie. Cela nécessite d'envisager une stratégie de vaccination plus efficace, de sélectionner les souches vaccinales les plus appropriées, et de mettre en œuvre une surveillance épidémiologique continue. Sans oublier le respect des mesures d'hygiène, de désinfection et de barrière sanitaire qui sont susceptibles de réduire la charge virale dans les exploitations avicoles.

Enfin, il serait intéressant d'approfondir la présente étude par d'autres travaux, pour essayer de pallier à certaines insuffisances dues au manque de temps et de moyens, et cela :

- En touchant à un nombre d'élevages plus important ;
- En procédant au séquençage d'un plus grand nombre d'isolats ;
- En menant une enquête épidémiologique à grande échelle auprès des vétérinaires et des éleveurs qui permettrait de mettre la lumière sur d'autres pratiques et/ou insuffisances en matière de prophylaxie sanitaire et médicale qui seraient derrière la persistance de la maladie de Gumboro malgré les efforts déployés pour la contrecarrer.

APPENDICES

APPENDICE A

LISTE DES ABBREVIATIONS.

AA (aa): acide aminé.

AOM: Anticorps d'origine maternelle (MDA en anglais).

ADNc: ADN complémentaire.

ARNm: ARN messenger.

BF: Bourse de Fabricius.

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool.

CEB: Chicken Embryo Bursa.

CEF: Chicken Embryo Fibroblasts.

CEK: Chicken Embryo Kydney.

DO: Densité Optique.

dsRNA: double strand RNA = ARN double brin ou bicaténaire.

ECP: Effet Cytopathogène.

F: Forward.

FTA® Card: Flinders Technology Associates® Card.

H&E : l'hématoxyline et l'éosine.

HVT: Herpes Virus of Turkey.

J: Jour.

IBD: Infectious Bursal Disease = Bursite infectieuse = maladie de Gumboro

IBDV: Infectious Bursal Disease Virus = Virus de la bursite infectieuse.

IDG: Immuno-Diffusion sur Gélose.

Ig: Immunoglobuline.

IL: Interleukine.

Kb: Kilo base.

kDa: kilo dalton.

Mabs: Monoclonal antibody = anticorps monoclonal.

MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis.

OIE: Office International des épizooties.

ORF: Open Ready Frame.

pb: Paire de Base.

PI: Post-inoculation.

pNS : Protéine non structurale.

pVP2: précurseur de VP2.

R: Reverse.

RdRp: RNA-dependant RNA-polymerase.

RFLP : Restriction fragment Length polymorphism.

RT-PCR: Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction.

SIAS: Sequence Identity And Similarity.

UV: Ultraviolet.

VP1: Viral Protein 1.

VP2: Viral Protein 2.

VP3: Viral Protein 3.

VPg: Viral genome-linked protein.

VN: viral neutralisation test ou test de neutralisation virale.

vvIBDV: very virulent Infectious Bursal Disease Virus.

APPENDICE B
PROTOCOLE DE VACCINATION POUR POULET DE CHAIR PRECONISE PAR
LA DSV (Décembre 2016)

AGE	Nom de la maladie	Type de vaccin	Mode d'administration préconisé
J1 (au couvoir)	- Bronchite infectieuse - Newcastle	- vaccin vivant (mass) - vaccin vivant atténué	- Nébulisation - Nébulisation
J7	- Newcastle	- vaccin vivant atténué	- Nébulisation
J12	- Bronchite infectieuse	- variant	- Nébulisation
J16-J18	- Gumboro	- intermédiaire (+)	- Eau de boisson
J25-J28	- Bronchite infectieuse - Newcastle	- mass - vaccin vivant atténué	- Nébulisation - Nébulisation

APPENDICE C

**PROTOCOLE DE VACCINATION POUR POULETTE DEMARREE PRECONISE
PAR LA DSV (Version 1 : avec vaccin Gumboro vectorisé à J1). (Décembre 2016)**

AGE	Nom de la maladie	Type de vaccin	Mode d'administration préconisé
J1 (au couvoir)	-Marek - Gumboro -Bronchite infectieuse - Newcastle	-vaccin vivant (Rispens) -vaccin vectorisé -vaccin vivant -vaccin vivant atténué	- Injectable - Injectable - Nébulisation - Nébulisation
J7	-Newcastle	-vaccin vivant atténué	- Nébulisation
J14	-Bronchite infectieuse	- variant + mass	-Nébulisation
J21	-Newcastle	- vaccin vivant atténué	- Nébulisation
J28	-Bronchite infectieuse	- vaccin vivant atténué (mass seul)	- Nébulisation
6ème semaine	-Bronchite infectieuse	-vaccin vivant atténué (variant)	- Nébulisation
7ème semaine	-Newcastle	- vaccin vivant atténué	- Nébulisation
8ème semaine	-Syndrome de la grosse tête	- vaccin vivant atténué	- Nébulisation
9ème semaine	-Variole aviaire -Newcastle et Bronchite infectieuse	- vaccin vivant atténué - vaccin inactivé	-Transfixion alaire - Injectable
16ème semaine	-Newcastle -Syndrome de la grosse tête -Syndrome de la chute de ponte (EDS) -Bronchite infectieuse	- vaccin inactivé - vaccin inactivé - vaccin inactivé - variant + mass	-Injectable

APPENDICE D

**PROTOCOLE DE VACCINATION POUR POULETTE DEMARREE PRECONISE
PAR LA DSV (Version 1 : avec vaccin Newcastle vectorisé à J1). (Décembre 2016)**

AGE	Nom de la maladie	Type de vaccin	Mode d'administration préconisé
J1 (au couvoir)	-Marek -Newcastle -Bronchite infectieuse -Gumboro	- vaccin vivant(Rispens) - vaccin vectorisé (HVT Newcastle) - vaccin vivant (mass) - vaccin vivant atténué	- Injectable - Injectable - Nébulisation - Nébulisation
J7	-Newcastle	-vaccin vivant	- Nébulisation
J12	-Bronchite infectieuse	- variant + mass	- Nébulisation
J18	-Gumboro	- vaccin vivant intermédiaire +	- eau de boisson
J28	-Newcastle	- vaccin vivant	- Nébulisation
6ème semaine	-Bronchite infectieuse	-vaccin vivant atténué (variant+mass)	- Nébulisation
7ème semaine	-Syndrome de la grosse tête	- vaccin vivant	- Nébulisation
8ème semaine	-Variole aviaire	- vaccin vivant	- Transfixion alaire
10ème semaine	-Bronchite infectieuse	- vaccin vivant atténué (mass)	- Nébulisation
16ème semaine	-Newcastle -Syndrome de la grosse tête -Syndrome de la chute de ponte (EDS) -Bronchite infectieuse	- vaccin inactivé - vaccin inactivé - vaccin inactivé - vaccin inactivé Mass+variant	-Injectable

APPENDICE E

LISTES DES DIFFERENTS TYPES DE VACCINS GUMBORO DISPONIBLES SUR LE MARCHE (listes non exhaustives et non actualisées).

1- LES VACCINS GUMBORO VIVANTS

1-1 Les vaccins vivants atténués à souches douces

- Nobilis Gumboro PBG 98 (Intervet) : souche vaccinale apathogène utilisable dès le premier jour sur des poussins dépourvus d'anticorps maternels.

1-2 Les vaccins vivants atténués intermédiaires

- BUR- 706 (Merial).
- Cevac Gumbo L (Ceva) : vaccin vivant atténué contre la Maladie de Gumboro, souche LIBDV « intermédiaire ».
- Nobilis Gumboro D 78 (Intervet).
- Bursine – 2 (Fort Dodge)
- Univax- BD (Schering – Plough) (surtout indiqué en injectable au couvoir).
- BURSA – VAC 3 (Schering- Plough) : souche classique intermédiaire.
- IBA- VAC (Fatro).
- GUMBORAL CT (Merial).
- AVIPRO Gumboro VAC (Lohmann Animal Health).

1-3 Les vaccins vivants atténués intermédiaires plus

- Cevac IBDL (Ceva) vaccin intermédiaire plus produit sur œufs SPF embryonnés inoculés à partir de la souche Winterfield 2512.
- Nobilis Gumboro 228 E (Intervet).
- Bursine Plus (FORT DODGE).
- IBA- VAC ST (Fatro).

1-4 Les vaccins vivants atténués à souche « Strong »

POULVAC Bursa F (Fort Dodge). Est dérivé d'une souche classique unique (V 877) qui ne cause pas de mortalités ni d'immunosuppression (contrairement aux souches « Hot » (chaudes) qui peuvent avoir un effet pathogène résiduel).

1-5 Les vaccins vivants atténués à souche « chaude »

- Avipro IBD XTREME (Lohmann Animal Health).

1-6 Les vaccins vivants atténués à complexe immun

- Cevac Transmune IBD (Ceva). Vaccin vivant atténué à complexe immun contre la maladie de Gumboro, souche Winterfield 2512, administré en in OVO ou en sous-cutané à J1.

1-7 Les vaccins vivants recombinants

- VAXXITEK (HVT+IBD) (laboratoire Merial) : vaccin bivalent contre Gumboro et Marek (vaccination au convoir).

1-8 Les vaccins vivants clonés

- CLONEVAC D-78 (Intervet) : vaccin vivant atténué intermédiaire cloné (peut être utilisé à J1).

2- LES VACCINS GUMBORO VIVANTS

- Cevac GK ou IBDK (Ceva) : vaccin contre Gumboro.
- Cevac ND G K ou ND IBD K (Ceva) : vaccin bivalent (contre Gumboro et Newcastle).
- Cevac ND IB G K ou ND IB IBD K (Ceva) : vaccin trivalent (contre Gumboro, Newcastle et BI).
- Bigopest (Merial) : vaccin trivalent (contre Gumboro, Newcastle et BI).
- Gumbopest (Merial): vaccin bivalent (Gumboro, Newcastle).
- Gmboriffa (Merial): vaccin contre Gumboro.
- Nobi- Vac Gumboro (Intervet): vaccin contre Gumboro.
- Nobi –Vac Gumboro + Newcastle (Intervet): vaccin bivalent.
- GUMB-VAC (Fatro): vaccin contre Gumboro.
- G-OLVAC (FATRO): vaccin bivalent (contre Gumboro et Newcastle).

APPENDICE F

DETAILS DE L'ETAPE "REACTION DE SEQUENCE"

1. Principe de base :

- Pour chaque produit PCR, deux réactions de séquence sont effectuées séparément : l'une utilisant l'amorce Forward (F) et l'autre l'amorce Reverse (R).
- Cela permet d'obtenir un brin sens (F) et un brin antisens (R) pour chaque échantillon.
- Les séquences obtenues sont ensuite alignées pour déterminer une séquence consensus ou "Contig".

2. Matériel nécessaire :

- **Thermocycleur** : Pour effectuer les réactions de séquence.
- **Pipettes multicanaux et monocanal** : Pour mesurer et distribuer les liquides.
- **Plaque PCR 96 puits et tubes PCR** : Contenant pour les réactions de séquençage.
- **Capuchons PCR et cônes** : Pour couvrir les tubes PCR et éviter la contamination.
- **Film adhésif** : Pour sceller la plaque PCR.
- **Tampon 5x (Applied Biosystems)** : Pour optimiser les conditions de la réaction.
- **Amorces F et R (10 µM)** : Les séquences d'ADN qui initient la réaction de séquençage.
- **Eau ultrapure DNase/RNase** : Eau pure exempte de contaminations qui pourraient dégrader l'ADN.
- **Kit BigDye Terminator v3.1** : Contient tous les composants nécessaires au séquençage, tels que :
 - **AmpliTaq (Taq polymérase)** : Enzyme qui synthétise l'ADN.
 - **dNTPs** : Nucléotides classiques utilisés pour l'élongation de l'ADN.
 - **ddNTPs marqués** : Nucléotides modifiés qui terminent l'élongation et sont fluorescents.
 - **MgCl₂** : Co-facteur enzymatique qui stabilise la réaction.

3. Préparation du mix de séquençage :

- **Composants du mix** : Pour chaque produit PCR, un mix est préparé contenant 4 µl d'eau ultrapure, 1 µl d'amorce, 1 µl de BigDye Terminator et 4 µl de tampon 5x.
- **Assemblage des réactions** : Dans chaque puits de la plaque, 10 µl du mix sont mélangés avec 10 µl de produit PCR purifié (Exo-SAP) pour un volume total de 20 µl. La plaque est ensuite scellée avec des capuchons PCR.

4. Programme de thermocycleur :

- **Dénaturation initiale** : 96°C pendant 3 minutes pour séparer les brins d'ADN.
- **Cycles de PCR** : 25 cycles consistant en :
 - **Dénaturation** : 96°C pendant 10 secondes.
 - **Hybridation** : 52°C pendant 5 secondes pour permettre l'attachement de l'amorce.
 - **Extension** : 60°C pendant 2 minutes et 30 secondes, où l'ADN est synthétisé jusqu'à ce qu'un ddNTP soit incorporé, stoppant ainsi l'élongation.

APPENDICE G

DETAILS DE L'ETAPE "PURIFICATION DE LA REACTION DE SEQUENCE"

1. **But de la purification :** Éliminer les excès de mix, notamment les fluorochromes utilisés pour la réaction de séquence.
2. **Procédure de purification :**
 - **Précipitation à l'éthanol :** Ajouter 50 µl d'éthanol à 80% par tube de plaque pour précipiter l'ADN.
 - **Centrifugation :**
 - À 4000 tours/minute pendant 15 minutes à 15°C pour séparer l'ADN précipité du surnageant.
 - Éliminer le surnageant en renversant la plaque.
 - **Élimination de l'éthanol résiduel :** Centrifuger à 1000 tours/minute pendant une minute pour éliminer les traces d'éthanol, puis laisser sécher à l'air libre pendant une nuit.
3. **Préparation pour l'électrophorèse capillaire :**
 - **Détection de l'ADN :** Ajouter 20 µl de formamide pour dénaturer l'ADN.
 - **Centrifugation finale :** 4000 tours/minute pendant une minute à 15°C pour préparer l'échantillon pour l'analyse par électrophorèse capillaire.

APPENDICE H

DETERMINATION DE LA SEQUENCE DES AMPLIMERES.

1. Analyseur génétique :

- Un **analyseur génétique à 96 capillaires** (Analyseur 3730 XI DNA, ABI Prism 377, DNA sequencer, Applied Biosystem) est utilisé pour séparer les fragments d'ADN générés lors de la réaction de séquence.
- L'analyse se fait par **électrophorèse capillaire**, une technique qui utilise des capillaires fins pour séparer les fragments d'ADN en fonction de leur taille.

2. Électrophorèse capillaire :

- Pendant l'électrophorèse, les fragments d'ADN migrent à travers les capillaires. Les fragments plus petits se déplacent plus rapidement que les plus grands.
- Chaque fragment d'ADN se termine par un ddNTP marqué par fluorescence (ddATP, ddCTP, ddGTP, ou ddTTP), ce qui permet de déterminer la base à l'extrémité de chaque fragment.

3. Analyse spectrale :

- L'analyse spectrale mesure la fluorescence spécifique des quatre types de ddNTPs. Chaque type de ddNTP émet une fluorescence différente, permettant d'identifier quelle base a été ajoutée à l'extrémité du fragment d'ADN.
- Cette analyse est effectuée à l'aide du **logiciel GeneMapper V4.0**.

4. Assignation des bases :

- Une étape appelée **assignation de bases** ("Base Calling") est effectuée. Cette étape détermine la séquence exacte des bases nucléotidiques dans l'ADN.
- Le résultat de cette analyse est présenté sous forme d'un fichier contenant un chromatogramme (représentation graphique de la fluorescence) et la séquence des bases sous forme de texte.

APPENDICE I**ARTICLE SCIENTIFIQUE PUBLIE DANS « Journal of Animal and Plant Science »**

Une partie des résultats présentés dans cette thèse ont été publiés dans Becheur et al., 2024, selon la référence suivante :

Becheur, M., Lounas, A., Messaoudi, O., Oumouna-Benachour, K., & Oumouna, M. (2024). Molecular Characterization of Infectious Bursal Disease Virus Isolated From Broiler And Pullet Flocks In Algeria. *Journal Of Animal And Plant Sciences-JAPS*, 34(1), 73-89. <https://doi.org/10.36899/JAPS.2024.1.0696>

Dont ci-dessous le contenu intégral :

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF INFECTIOUS BURSAL DISEASE VIRUS ISOLATED FROM BROILER AND PULLET FLOCKS IN ALGERIA

M. Becheur^{1, 5*}, A. Lounas², O. Messaoudi³, K. Oumouna-Benachour⁴ and M. Oumouna⁴

¹Department of Agronomy, Faculty of Sciences, University of Laghouat, Laghouat, Algeria

²Department of Medicine and Animal Surgery, Veterinary Sciences Institute, University of Blida, Blida, Algeria

³Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Laghouat, Laghouat, Algeria

⁴Department of Natural Sciences and Life, Faculty of Sciences and Technology, University of Medea, Medea, Algeria

⁵Laboratory of Animal Biotechnology, Veterinary Sciences Institute, University of Blida, Blida, Algeria

*Corresponding author's email: mourad_becheur@yahoo.fr

ABSTRACT

Infectious bursal disease (IBD) or Gumboro disease is an acute, highly contagious viral disease of young chickens characterised by haemorrhagic syndrome, severe damage in the cloacal bursa, immunosuppression, and high mortality, generally at 3–6 weeks of age. The present study was performed to investigate the molecular characteristics and histopathological effects of infectious bursal disease virus (IBDV) isolated from broiler and pullet flocks in eastern and central Algeria. Fifty-five chickens collected from eleven broiler and pullet farms were investigated for IBD outbreaks over the period of 2019–2020. Only the birds with clinical signs and macroscopic lesions indicating IBD were selected for histopathological examination and molecular investigations using reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) followed by sequencing. Except for Flock N°4, all the birds in the study showed microscopic lesions of IBD. RT-PCR confirmed IBDV infection in samples from flocks N°1, 2, 3, 9, 10, and 11. Using sequencing, a very virulent IBDV (vvIBDV) strain was detected in samples N°10 and 11. The studied strains exhibited four conserved amino acids (222A, 256I, 294I, and 299S), characteristic of vvIBDV. According to the phylogenetic tree, the two strains in the study were closely related to previously isolated vvIBDVs and clustered together. This result may explain the frequent vaccine failure against IBD observed in broiler and pullet flocks in Algeria.

Keywords: Molecular characterization, sequencing, vvIBDV, chickens, Algeria

This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Published first online November 12, 2023

Published final January 20, 2024

INTRODUCTION

In Algeria, poultry industry plays a significant role in the agricultural sector. As per FAOSTAT (2023), the country produced 257,000 tons of poultry meat and 305,000 tons of eggs in 2021. This activity is vital for the population as it serves as a crucial source of protein through meat and eggs, while simultaneously providing a reliable source of income for farmers. Despite these facts, the contribution of poultry production to human nutrition and the country's economy is still limited by various factors such as high production costs, a lack of appropriate breeding practices, and infectious diseases. Infectious bursal disease (IBD) is an immunosuppressive disease of young chickens of worldwide prevalence (Eterradossi and Saif, 2020). The disease, also named "Gumboro disease" according to the location of the first outbreaks in Gumboro, Delaware, USA, was later designated infectious bursal disease (IBD) according to varying morphologic and histological changes observed in the bursa of Fabricius (Hitchner, 1970). IBD causes

severe direct and indirect economic losses to the poultry industry and farmers worldwide

(Spackman *et al.*, 2017; Brown Jordan *et al.*, 2018).

The causal agent of IBD is infectious bursal disease virus (IBDV), a non-enveloped double-stranded RNA (dsRNA) virus that is, a member of the family *Birnaviridae* and genus *Avibirnavirus* (Dobos *et al.*, 1979; Müller *et al.*, 2003). The genome of IBDV is composed of two segments known as A and B. Segment A comprises a larger open reading frame 1 (ORF1), which encodes a polyprotein of 110 kDa that splices into three viral proteins (VP2, VP3, and VP4) through autocatalytic mechanisms, according to Mató *et al.* (2020). VP2 and VP3 are structural proteins, while VP4 acts as a protease, as reported by Morgan *et al.* (1988) and Bidin *et al.* (2001). Additionally, a small ORF1 gene present in segment A encodes VP5, which is a non-structural protein as Mundt *et al.* (1995) pointed out. On the other hand, segment B contains only one ORF gene that encodes VP1, which is the viral RNA polymerase (Hudson *et al.*, 1986; Berg, 2000; Qin and Zheng 2017).

Two serotypes of IBDV (Serotype 1 and serotype 2) and several antigenic subtypes of serotype 1 viruses have been identified using cross-virus neutralization (VN) assays (Jackwood and Jackwood, 1997). The serotype 1 strains are pathogenic to chickens and vary in their virulence, whereas serotype 2 strains, isolated from turkeys, are apathogenic for both turkeys and chickens (McFerran *et al.*, 1980). Serotype 1 has been classified into different groups based on antigenic variation, virulence, and molecular characteristics of the hypervariable region (HVR) of VP2. These groups include attenuated IBDV, classical IBDV, variant IBDV, and very virulent IBDV (vvIBDV) (Sharma *et al.*, 1989; van den Berg *et al.*, 2004; Jackwood *et al.*, 2018).

The four strains of IBDV have a global distribution and are present in most countries in poultry industry. The classical strains of IBDV can cause damage to the bursa and lymphoid necrosis, leading to a mortality rate of 1-30% (Müller *et al.*, 2003; Mawgod *et al.*, 2014). On the other hand, variant IBDVs are characterised by antigenic drift, which is caused by point mutations affecting the neutralising epitopes of VP2 (Vakharia *et al.*, 1994; Rajkhowa *et al.*, 2018). These strains were first identified in North America, where they caused B lymphocyte depletion without inducing an inflammatory response or clinical signs of disease (Sharma *et al.*, 1989). In the mid-1980s, vvIBDV strains emerged in Europe and caused devastating outbreaks, resulting in 50-100% mortality in young chickens (Berg, 2000; Eterradossi and Saif, 2013). These strains then spread to the Middle East, Asia, South America and Africa (Abdel-Alim *et al.*, 2003; Gómez *et al.*, 2018). The main approach to prevent IBD is a combination of immunisation and biosecurity measures (Müller *et al.*, 2012; Thomrongsuwannakij *et al.*, 2021). However, despite vaccination, farmers still encounter difficulties with this disease (Ali Khan *et al.*, 2019), as vaccination failures have been documented in numerous locations worldwide (Müller *et al.*, 2012). These failures have been attributed to various factors (Islam *et al.*, 2008; Becheur and Oumouna, 2019), including inadequacy between the vaccine strain and the field strain of IBDV circulating in farms.

In Algeria, IBD was first observed in poultry production in the late 1980s (Allamigeon and Comte, 2001; Abed *et al.*, 2018). In 2000, the partial sequencing of the VP2 gene from seven IBDV isolates led to the initial suspicion of vvIBDV in Algeria (Bouadaoud and Alloui, 2008). After a few years, the clinical picture of IBD in various regions of Algeria shifted, with significantly higher mortality rates, compared to the classical form. This led to the hypothesis that hypervirulent strains may have spread as a result of genetic mutations within the IBDV genome. In this context, Bouadaoud (2015) reported the presence of a highly virulent IBDV strain in Eastern Algeria. Three

years later, another study (Abed *et al.*, 2018) revealed the circulation of IBDVs related to reassortments and the European vvIBDV.

Although a wide range of vaccines against IBD are used in Algeria, losses due to this disease have not decreased likely due to the circulation of vvIBDV, which has been implicated in most vaccination failures (Lukert and Saif, 2003; Thomrongsuwannakij *et al.*, 2021). The present study aimed to check the persistence of vvIBDV in eastern and central Algeria by conducting molecular characterization of circulating strains. Additionally, it sought to establish the relationship between the identified viruses and IBDV reference strains from Algeria and other regions worldwide. The study also included a histopathological examination of the investigated birds, in order to explore the effect of these field strains on the bursa of Fabricius.

MATERIALS AND METHODS

Ethical approval: All experimental procedures were approved by the Institutional Animal Care Committee of the National Administration of the Algerian Higher Education and Scientific Research (Ethical approval number: 98-11, Law of 22 August, 1998) and were conducted according to the recommendations of the "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals".

Flock history: To investigate IBD outbreaks, fifty-five birds collected from eleven chicken flocks were examined in eastern and central Algeria between 2019 and 2020. The suspected outbreaks of IBD were identified in broiler chickens (flocks N°1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, and 8) and pullet chickens (flocks N°9, 10, and 11) based on clinical signs and gross lesions.

The mortality rate in affected broilers ranged from 2% to 9%, while in affected pullets, it was 71% and 47.8% in flocks N°10 and 11, respectively. In both broiler and pullet affected flocks, the clinical signs presented were reduced appetite and activity, whitish watery diarrhoea, prostration ruffled feathers, huddling, somnolence, and death. At necropsy, various gross changes were seen in bursa of Fabricius in bird flocks detected IBDV. There were edema, hemorrhage, and enlargement in some bursae of Fabricius. In addition, petechial and hemorrhages were seen on the breast and thigh muscles of IBDV infected birds.

All of the flocks had been immunized against IBD, with the exception of flock N°10's pullets. The live vaccines that were predominantly used were of the "intermediate" strain, with the exception of flock N°3, which was given an attenuated vaccine. Information regarding the sampling region, type of breeding, the IBD primary vaccination date, IBD vaccine strains, age of birds at clinical outbreak, mortality rate and age at sampling time is summarised in Table 1.

Table 1. Flock history.

Flock number	Region in Algeria	Breeding	Age at first IBD vaccination	IBD vaccines used	Age at the outbreak	Mortality rate (%)	Age at sampling
1	Center	Broilers	16 d	Intermediate	32 d	6.2	33 d
2	Center	Broilers	15 d	Intermediate	24 d	8%	26 d
3	Center	Broilers	15 d	Low vaccine strain	27 d	4.5%	29 d
4	East	Broilers	15 d	Intermediate	27 d	2.2%	31 d
5	East	Broilers	15 d	Intermediate	30 d	3%	33 d
6	East	Broilers	11 d	Intermediate	21 d	9%	24 d
7	East	Broilers	13 d	Intermediate	37 d	4.6%	38 d
8	East	Broilers	14 d	Intermediate	28 d	3.9%	29 d
9	Center	Broilers	14 d	Intermediate	20 d	1.8%	28 d
10	Center	Pullets	Not vaccinated	Not vaccinated	24-26 d	71%	27_30 d
11	Center	Pullets	20 d	Intermediate	24-27 d	47.8%	24_27 d

IBD: Infectious bursal disease

Histopathology: Fifty-five bursae from freshly dead or sacrificed birds were collected from 11 flocks and stored in 10% buffered formalin solution for histopathological analysis. Only the bursa of Fabricius showing necropsy findings (edema, haemorrhages and enlargement) were examined histopathologically.

The tissues were cut into sections, identified and dehydrated using a series of graded alcohols (70%, 80%, 90%, 95% and 100%). The blocks were cleared in xylene and infiltrated with molten paraffin wax. Sections (5 µm) were cut from the embedded tissues using a microtome. The tissues were mounted on clean grease-free glass slides, and kept at 25 °C, and then stained with hematoxylin and eosin (H&E) (Luna, 1968). The prepared slides were examined using a light microscope at 20x, 100x, and 200x magnification. Photomicrographs of the tissues were captured using a digital microscopic objective camera.

Molecular characterization

Sample collection: Fifty-five fresh bursas were collected from 11 broiler and pullet flocks suspected of IBD. Bursas from each outbreak were cut open, and imprinted directly onto a Flinders Technology Associates® card (FTA® card (Whatman)). These cards are suitable for capturing and preserving viral RNA, as well as facilitating transportation (Moscoso *et al.*, 2006).

Viral RNA extraction from FTA® card: Three discs (2 mm in diameter) were cut from the spotted area of each FTA® card (Whatman, GE Healthcare, UK) using a sterile puncher (Harris Micro-Punch) and placed in 1.5 mL Eppendorf tubes. For each tube containing FTA® paper discs, 250 µL of TE buffer was added, vortexed, and incubated for 10 min at 25 °C (Moscoso *et al.*, 2006; Amin and Jackwood, 2014). The QIAamp® Viral RNA Mini Kit (QIAGEN GmbH, Germany) was used to extract RNA from the FTA® paper according to the

manufacturer's instructions. The RNA product was stored at -20 °C until analysis.

Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR): RNA purity and concentration were determined using NanoDrop spectrophotometre (NanoDrop 1000c, Thermo Scientific, Waltham, USA). Conventional RT-PCR was performed using an automatic DNA thermal cycler (Chromo-4; Bio-Rad)). A one-step RT-PCR Kit (Qiagen, Germany) was used according to the manufacturer's instructions. Primers VP2 F5'-GCCGATGATTACCAATTC-3' and VP2 R5'-GTGACGGGACGGAGGGCC-3' were used to amplify a 422-bp sequence of the hypervariable region of the VP2 gene of IBDV from bp 762-1184 region. (Regarding the reference of the primers, please refer to our reply in the cover letter)

A VP2 region was amplified as follows: 20 min at 50 °C (RT reaction); 15 min at 95 °C (initial PCR activation); 35 cycles at 94 °C for 30 s (denaturation), 59 °C for 40s (annealing) and 72 °C for 1 min, and 72 °C for 10 min (final extension). Positive (IBD vaccine strain) and negative (nuclease-free water) controls were included in each PCR run.

After amplification, RT-PCR products were subjected to electrophoresis on 2% agarose gel containing ethidium bromide. The band was examined using a UV-light trans-illuminator. The PCR products were purified using a QIA-quick Gel Extraction Kit (Qiagen) following the manufacturer's instructions.

Sequencing of the hypervariable region of VP2 gene: The purified PCR products were sequenced using a BigDye Terminator V3.1 Cycle Sequencing Kit (Perkin-Elmer, Foster City, CA, USA). The sequencing reactions were then purified, followed by loading onto a sequencer plate with capillary electrophoresis using an ABI PRISM 3730xl Genetic Analyser developed by Applied Biosystems (ABI), USA. Nucleotide sequences were assembled and edited using BioEdit software, version

7.2.1. DNA sequences for the present study were submitted to GenBank of NCBI (National Centre for Biotechnology Information, USA) and deposited in this database under accession numbers: MT104575 and MT104576.

Sequence and phylogenetic analysis: The nucleotide and deduced amino acid (aa) sequences were aligned to those of IBDV reference strains from GenBank (listed in Table 2). The Clustal W method was used to perform multiple alignments using the molecular evolutionary

genetics analysis (MEGA) version 7. The phylogenetic tree was constructed using the neighbour-joining method with 1000 bootstrap replicates in MEGA 7.

The aim of the phylogenetic analysis was to determine the relationship between the two Algerian strains isolated during the current study and reference strains of IBDV (including classical, attenuated/vaccinated, vv, and variant reference strains of IBDV) from Algeria and various other parts of the world (as enumerated in Table 2).

Table 2. Infectious bursal disease virus (IBDV) reference strains used in the present study.

N°	IBDV Strains	Virulence	Origin and year	GenBank accession number	IBDV segment
1	Faragher 52-70	Classic	England	Y14958	VP2 (segment A)
2	STC	Classic	USA	D00499	Segment A of IBVD
3	Cu-1 M	Attenuated/vaccine	Germany	AF362771	
4	Bursa Vac	Attenuated/vaccine		AF498633	VP2 (Segment A)
5	Cloned D78 strain	Attenuated/vaccine	NOBILIS (1997)	Y14962	VP2 (Segment A)
6	Cevac IBDL	Attenuated/vaccine	CEVA (2008)	EU544157	VP2 (Segment A)
7	150124	vvIBDV/reassortant	Algeria (2018)	KY555572	VP2 (Segment A)
8	150128	vvIBDV	Algeria (2018)	KY555578.1	VP2 (Segment A)
9	150133	vvIBDV	Algeria (2018)	KY555586.1	VP2 (Segment A)
10	150142	vvIBDV/reassortant	Algeria (2018)	KY555594	VP2 (Segment A)
11	150144	vvIBDV/reassortant	Algeria (2018)	KY555598	VP2 (Segment A)
12	03ALG	vvIBDV	Algeria (2015)	KP729478	VP2 (Segment A)
13	09ALG	vvIBDV	Algeria (2015)	KP729479	VP2 (Segment A)
14	20ALG	vvIBDV	Algeria (2015)	KP729480	VP2 (Segment A)
15	38ALG	vvIBDV	Algeria (2015)	KP729481	VP2 (Segment A)
16	50ALG	vvIBDV	Algeria (2015)	KP729482	VP2 (Segment A)
17	399_Algeria	vvIBDV	Algeria (2017)	MF142528	VP2 (Segment A)
18	P07	vvIBDV	Tunisia	AY665672	Segment A
19	UK661	vvIBDV	England (1989)	X92760	VP2 (segment A)
20	D6948	vvIBDV	Netherland (1989)	AF240686	Segment A
21	849VB	vvIBDV	Belgium (1989)	AY321949	Segment A
22	89163	vvIBDV	France	HG974563	Segment A
23	OKYM	vvIBDV	Japan (1991)	D49706	Segment A
24	HK46	vvIBDV	Hong Kong (1994)	AF092943	Segment A
25	E/Delaware	Variant	USA (1985)	AF133904	Segment A
26	GLS	Variant	USA (1987)	M97346	Segment A
27	OH	Serotype 2	USA (1982)	M66722	Non-pathogenic (Segment A)
28	MBechIBDVdz1	To be determined	Algeria (present study)	MT104575	VP2 (Segment A)
29	MBechIBDVdz2	To be determined	Algeria (present study)	MT104576	VP2 (Segment A)

RESULTS

Clinical signs: The disease appeared suddenly with death, and spread rapidly in the infected flocks. The age at the outbreak was 21 to 30 day for all investigated flocks. Mortality rates in clinically affected broiler flocks ranged

from 2% to 9%. Very high mortality was reported in pullet flocks N°10 and 11 (71% and 47.8%, respectively). The clinical signs were anorexia, whitish watery diarrhea, depression, ruffled feathers, huddling together, somnolence, and death.

Clinical signs observed in broilers were similar to those observed in pullets, except that the disease was accompanied with very high mortality in pullets.

Necropsy and histopathological findings: The gross lesions of the muscles and bursa of Fabricius (BF) of the affected birds are presented in Table 3 and illustrated in Figure 1 (necropsy).

The main histopathological bursal findings consisted of lymphocyte depletion and interstitial oedema in the medullary area of the bursal follicles. The lymphocytes were soon replaced by heterophils, pyknotic debris, and hyperplastic reticuloendothelial cells.

The details of these histopathological lesions are presented in Table 3 and illustrated in Figures 3, 4, 5, and 6. The normal appearance of the bursa is illustrated in Figure 2.

Table 3. The gross and histopathological lesions of infected flocks.

Flock number	Mortality rate (%)	Gross lesions	Histopathological lesions of the bursa of Fabricius
1; 2; 3.	6.2; 8 and 4.5 respectively	Swollen oedematous bursa (Figure 1-b) Muscular haemorrhages (Figure 1-a)	Mild to extensive depletion of lymphocytes. Interstitial oedema and influx of heterophils and macrophages (Figure 3). Normal Bursa (Figure 2).
4	2.2	0	Normal Bursa (Figure 2).
5; 6; 7; 8; 9.	3; 9; 4.6; 3.9 and 1.8 respectively	Swollen oedematous bursa. Muscular haemorrhages.	Follicular lymphocytic depletion. Extensive heterophil infiltration of interstitium. Apoptotic and degenerate lymphocytes. Macrophage and heterophil infiltration. Interstitial oedema (Figure 4).
10	71	Swollen oedematous bursa. Severe haemorrhages in breast and thigh muscles.	Extensive depletion of lymphocytes with densely staining necrotic foci. Marked interstitial oedema and hyperplasia. Epithelium reactive and hyperplastic. Necrotic focus consisting of macrophages and cellular debris. Interstitial inflammatory cells (Figure 5).
11	47.8		Marked pallor, lymphocyte depletion and oedema, reactive and extensively hyperplastic epithelium (Figure 6).

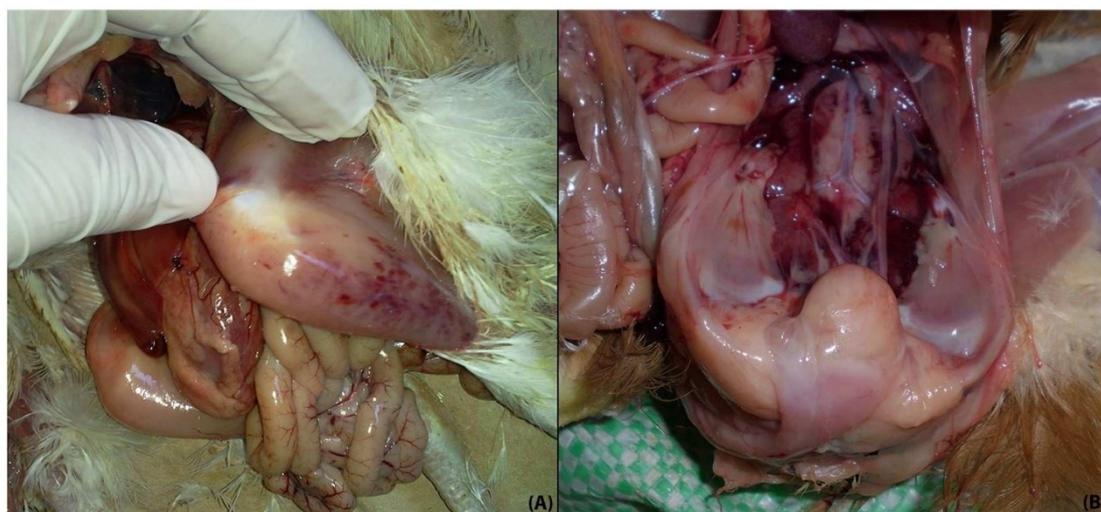


Figure 1. Gross lesions in IBD-suspected birds. (A): Muscular (thigh) haemorrhages, (B): Swollen oedematous bursa.

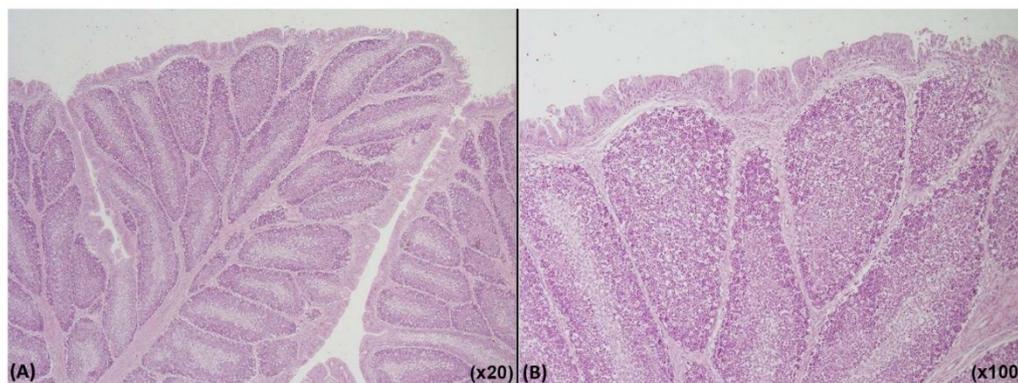


Figure 2. (A): Normal bursa with densely populated outer cortices of lymphocytes and sparsely populated medullae. Lobules subdivided by connective tissue. Luminal surface covered with pseudo stratified columnar epithelium (H&E, 20 \times). (B): Normal bursa, as left (H&E, 100 \times).

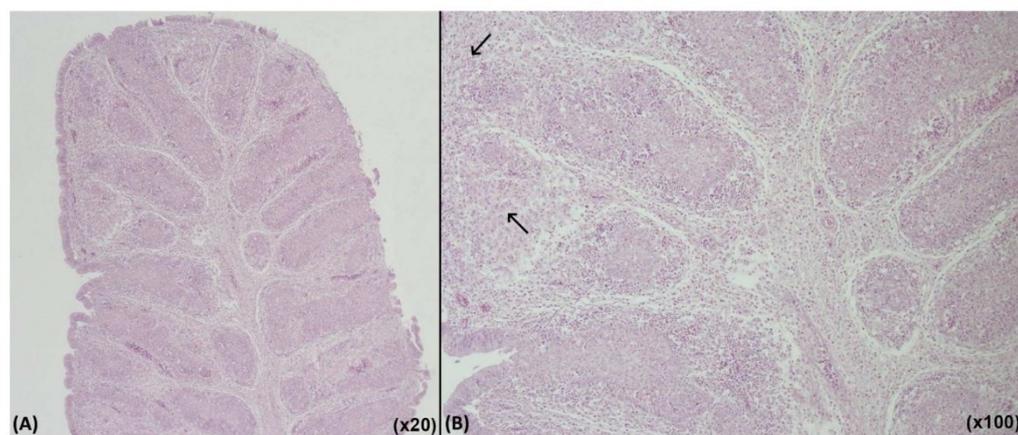


Figure 3. (A): Marked pallor due to extensive depletion of lymphocytes. Structure, architecture, and epithelium normal (H&E, 20 \times). (B): Extensive depletion of lymphocytes of the BF (arrows). Interstitial oedema and influx of heterophils and macrophages (H&E, 100 \times).

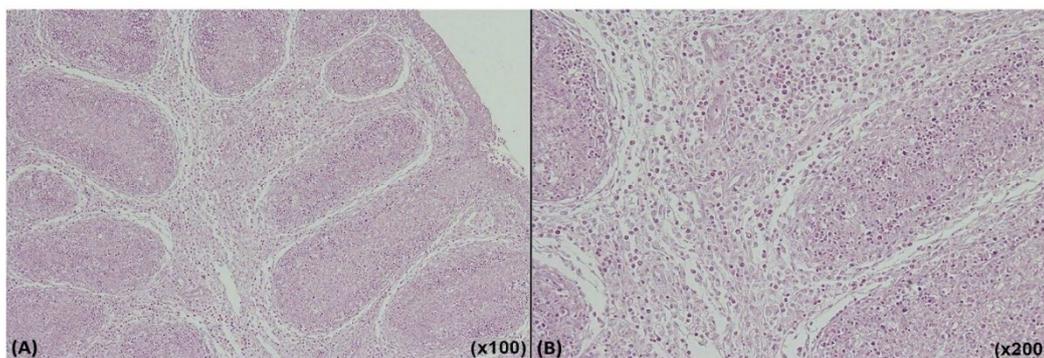


Figure 4. (A): Follicular lymphocytic depletion in the BF. Extensive heterophil infiltration of interstitium (H&E, 100 \times). (B): Apoptotic and degenerate lymphocytes. Macrophage and heterophil infiltration. Interstitial oedema (H&E, 200 \times).

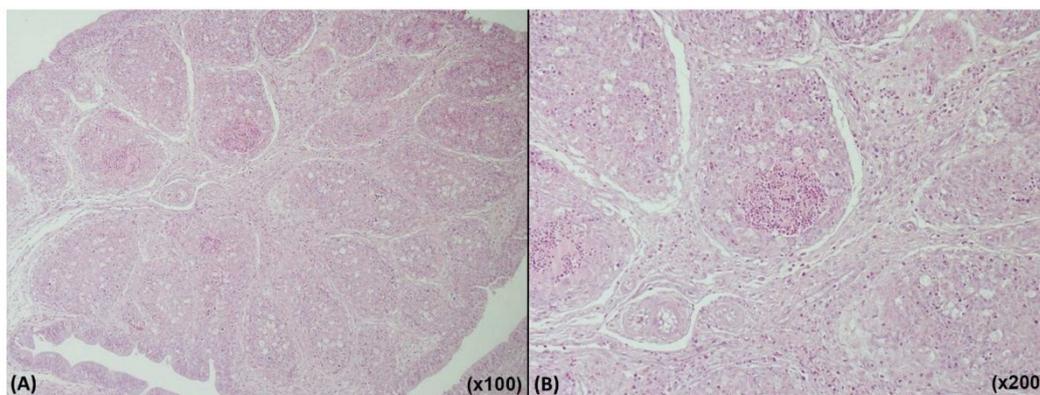


Figure 5. (A): Extensive depletion of lymphocytes with densely staining necrotic foci in the BF. Marked interstitial oedema and hyperplasia. Epithelium is reactive and hyperplastic (H&E, 100×). (B): Necrotic focus consisting of macrophages and cellular debris. Interstitial inflammatory cells (H&E, 200×).

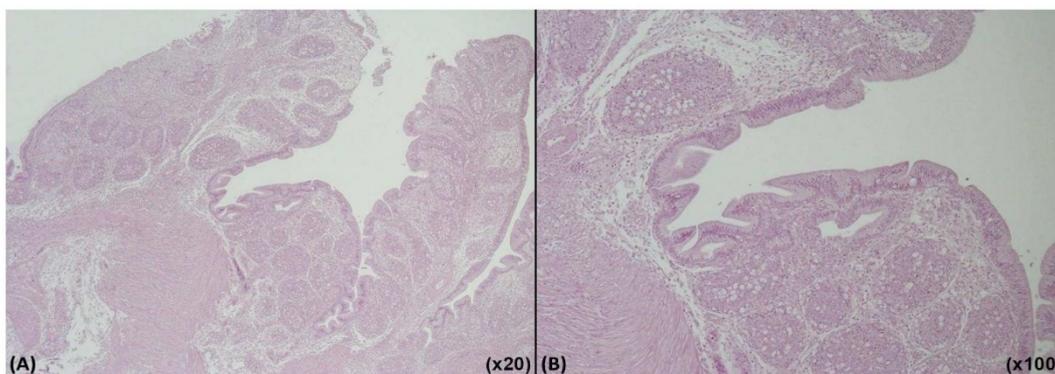


Figure 6. Marked pallor, lymphocyte depletion, and oedema in the BF. Reactive and extensively hyperplastic epithelium. (A): H&E, 20×; (B): H&E, 100×.

Molecular characterization

RT-PCR: Using RT-PCR, the IBDV was detected in 6 out of the 11 investigated chicken flocks (54.5%) namely, flocks N°1, 2, 3, 9, 10, and 11. The viral RNA extracted from the FTA[®] card showed specific amplification of the VP2 gene with a size of 422 bp. The specificity of the RT-PCR was further confirmed by the absence of amplification in the negative control.

Amino-peptide analysis: Two out of the six RT-PCR positive samples were selected for sequencing. In the current study, the two nucleotide sequences (MBechIBDVdz1 and MBechIBDVdz2) were aligned and their deduced amino-acid sequences at positions 211-350 were compared to the VP2 hypervariable region of 27 global isolates of both virulent and attenuated IBDVs, which included 11 Algerian IBDVs and serotype 2 of IBDV available in the NCBI database. Figure 7 illustrates this comparison.

The studied strains were found to possess four conserved amino acids (222A, 256I, 294I, and 299S), which are characteristic of vvIBDV according to previous studies (Brown and Skinner, 1996; Yilmaz *et al.*, 2019), as shown in Figure 7.

In addition, the virulent phenotype of our Algerian strains was determined by the co-existence of amino acids 279D and 284A, as reported in previous studies (Yamaguchi *et al.*, 1996; Brandt *et al.*, 2001; Mahgoub *et al.*, 2012).

Figure 7 shows that the two strains analyzed in this study had the serine-rich heptapeptide sequence '326SWSASGS332' adjacent to the second major hydrophilic region, which is a known marker of virulent IBD strains, as previously reported by Brown and Skinner (1996), Hernández *et al.* (2006) and Alkhalefa *et al.* (2019).

The different substitutions are summarised in Table 4.

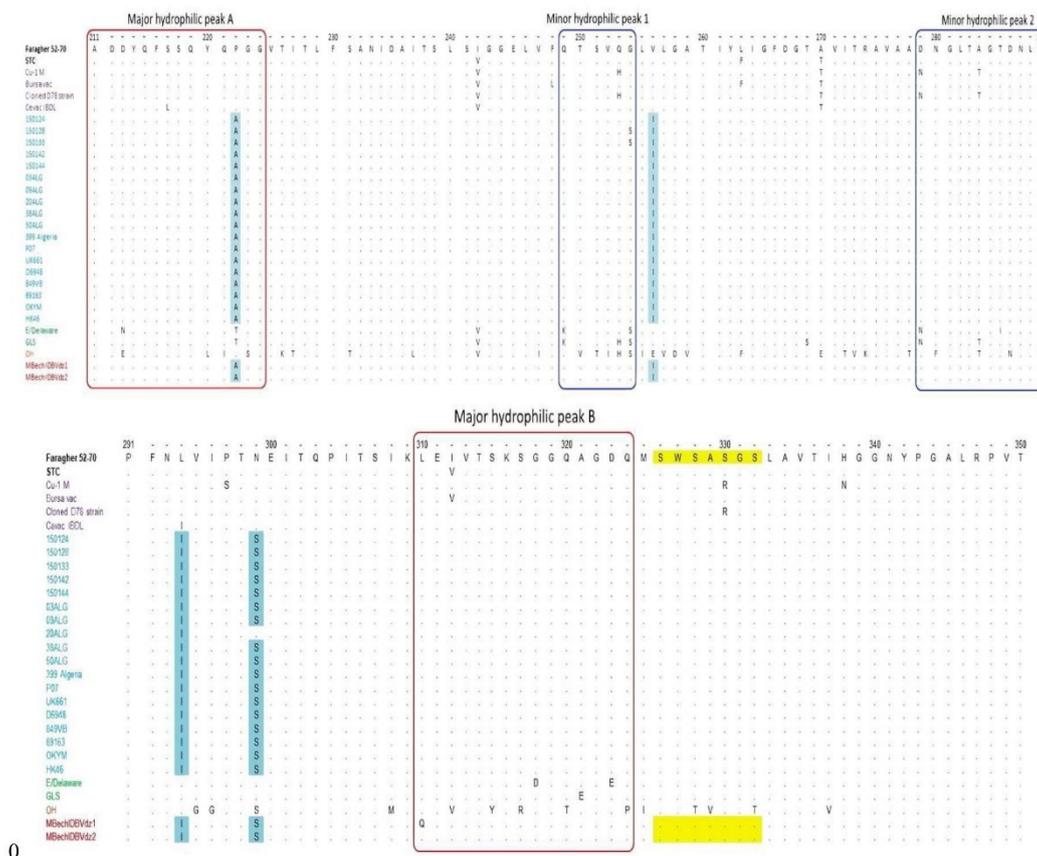


Figure 7. Alignment of deduced amino acid sequences of the VP2 hypervariable region from aa positions 211-350 of IBDV strains. Dots indicate positions with aa identical to the reference Faragher 52-70 strain. Major hydrophilic peaks are boxed with red lines and minor hydrophilic peaks are boxed with blue lines. Amino acid positions are as per Bayliss et al. (1990). The 222 (A), 256 (I), 294 (I), and 299 (S) aa positions are characteristic of vvIBDV. Heptapeptide ‘SWSASGS’, a serine rich area (enclosed in yellow box), is indicative of virulent IBD strains.

Table 4. Comparison of the characteristic amino acid residues between the strains of the present study with infectious bursal disease virus (IBDV) reference strains.

	Amino acid position (as per Bayliss et al., 1990)									
	222	249	253	254	256	279	284	294	299	330
Classical strains (Faragher 52-70).	P	Q	Q	G	V	D	A	L	N	S
Attenuated/vaccine strains (Cu-1 M, Bursa Vac, D 78, IBDL).	P	Q	Q ¹ H ²	G	V	N ²	T ²	L	N	R ² S ¹
vvIBDV strains (Algerian vvIBDV strains (Boudaoud, 2015; Abed et al, 2018) and other vvIDV (UK661, 849VB, 89163, OKYM...)).	A	Q	Q	G	I	D	A	I	S	S
Variant strains (E Delaware, GLS).	T	K	Q ³ H ⁴	S	V	N	A ³ T ⁴	L	N	S
Strains of present study (MBechIBDVdz1, MBechIBDVdz2).	A	Q	Q	G	I	D	A	I	S	S

¹ Bursa Vac; IBDL

² Cu-1 M; D78

³ E Delaware

⁴ GLS

Nucleotide identity percentage: The sequence analysis involved a comparison of the nucleotide (genetic) identity of the studied strains with that of reference IBDV strains.

To calculate pairwise sequence identity and similarity from multiple sequence alignments, the SIAS tool was utilised. The detailed results are presented in Table 5.

Table 5. Nucleotide identity percentage between strains of the present study and selected infectious bursal disease virus (IBDV) strains.

N°	IBDV Strains	Virulence	Origin and year	Identity percentage between strains of the present study and selected IBDV strains	
				MBechIBDVd1	MBechIBDVd2
1	Faragher 52-70	Classic	England	93.79	94.03
2	STC	Classic	USA	93.07	93.31
3	Cu-1 M	Attenuated/vaccine	Allemagne	91.40	91.64
4	Bursa Vac	Attenuated/vaccine		93.07	93.31
5	Cloned strain D78	Attenuated/vaccine	NOBILIS(1997)	91.88	92.12
6	Cevac IBDL	Attenuated/vaccine	CEVA (2008)	93.07	93.31
7	150124	vvIBDV	Algeria (2018)	99.28	99.52
8	150128	vvIBDV	Algeria (2018)	98.32	98.56
9	150133	vvIBDV	Algeria (2018)	98.56	98.8
10	150142	vvIBDV/Reassortant	Algeria (2018)	99.76	100
11	150144	vvIBDV/Reassortant	Algeria (2018)	99.76	100
12	03ALG	vvIBDV	Algeria (2015)	98.8	99.04
13	09ALG	vvIBDV	Algeria (2015)	98.8	99.04
14	20ALG	vvIBDV	Algeria (2015)	99.04	99.28
15	38ALG	vvIBDV	Algeria (2015)	98.32	98.56
16	50ALG	vvIBDV	Algeria (2015)	98.8	99.04
17	399_Algeria	vvIBDV	Algeria (2017)	98.8	99.04
18	P07	vvIBDV	Tunisia	96.89	97.13
19	UK661	vvIBDV	England (1989)	96.42	96.65
20	D6948	vvIBDV	Netherlands (1989)	97.13	97.37
21	849VB	vvIBDV	Belgium (1989)	97.13	97.37
22	89163	vvIBDV	France	96.89	97.13
23	OKYM	vvIBDV	Japan (1991)	96.65	96.89
24	HK46	vvIBDV	Hong Kong (1994)	96.89	97.13
25	E/Delaware	Variant	USA (1985)	91.64	91.88
26	GLS	Variant	USA (1987)	90.93	91.16
27	OH	Serotype 2	USA (1982)	72.31	72.55

N.B: nucleic acid identity percentage between MBechIBDVd1 and MBechIBDVd2 is 99.76%

In the current study, the nucleotide identity between the two studied strains and the serotype 1 viruses, including classical, attenuated, variants, and hypervirulent, varied. It was comparatively lower in classical, attenuated, and variant viruses (ranging from 90.93% to 94.03%), and higher in hypervirulent viruses (ranging from 97% to 100%), as presented in Table 5.

The lowest percentage of nucleotide identity was recorded for the OH strain, serotype 2 (apathogenic), which showed values of 72.31% and 72.55% (Table 5).

The strains analysed in this study shared a high degree of similarity (ranging from 98.32% to 99.28%) with Algerian hypervirulent strains identified by

Boudaoud in 2015 (03Alg, 09Alg, 20Alg, 38Alg, and 50Alg) and strain 399_Alger (Michel and Jackwood, 2017). They also exhibited a very high level of similarity (ranging from 99.28% to 100%) with hypervirulent and reassortant strains studied in Algeria in 2018 by Abed *et al.* (150124, 150128, 150133, 150142, and 150144) (refer to Table 5).

Phylogenetic analysis: A phylogenetic tree of VP2 gene-based sequences was constructed using the neighbor-joining method with 1000 bootstrap replicates, as shown in Figure 8.

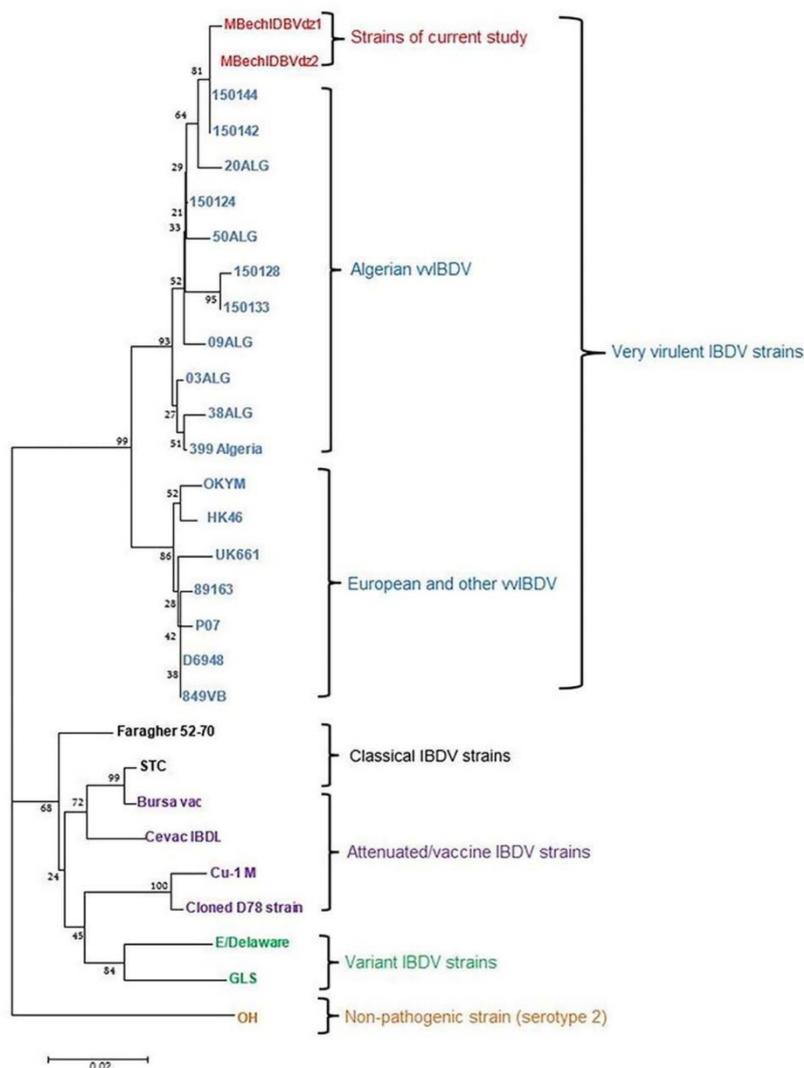


Figure 8. Phylogenetic tree based on partial sequencing of the VP2 gene, showing the relationship between the two Algerian strains isolated in the present study and other Algerian and IBDV reference strains (classical, attenuated/vaccinated, vv and variant reference strains of IBDV).

Phylogenetic investigation of nucleotide sequences indicates clustering of IBDV based on virulence and geographical locations. Classical, attenuated/vaccinated and variant IBDV formed a separate clade from vvIBDVs.

According to the phylogenetic tree (Figure 8), the two strains examined in the present study (MBechIBDVdz1 and MBechIBDVdz2) are closely related to previously isolated Algerian vvIBDVs, as they are clustered together.

DISCUSSION

IBD, known for its immunosuppressive effect on young chickens, has caused significant financial losses in the poultry industry worldwide, particularly in the last decade (Wagari, 2021).

To control the IBDV infection, broiler and pullet chicks are immunized with intermediate or intermediate-plus strains, while breeders receive live attenuated and inactivated vaccines (Thai *et al.*, 2021).

Despite strict biosecurity measures and intensive immunization programs, IBD outbreaks still occur worldwide (Spackman *et al.*, 2017). This may be due to frequent genetic changes, genomic recombination, and reassortment of the viral genome, which can result in vaccine failure (Mwenda *et al.*, 2018).

The sudden shift in the clinical picture of IBD across various regions in Algeria, characterized by significantly higher mortality rates compared to the classical form, has prompted the hypothesis that hypervirulent strains may have spread as a result of genetic mutations within the IBDV genome.

The aim of this research was to check the persistence of vvIBDV by conducting molecular analysis of strains present in eastern and central Algeria. Additionally, it aimed to establish the relationship between the viruses identified in this study and IBDV reference strains from Algeria and other regions worldwide.

The mortality rates observed in pullet flocks affected by the vvIBDV strain align with previously documented rates in literature on this strain, as reported by Berg (2000), Eterradossi and Saif (2013) and Shekhar and Dalai (2020). Research has shown that layer-type chickens, or pullets, are more vulnerable to vvIBDV compared to broiler-type chickens, as noted by Silva *et al.* (2016) and Shekhar and Dalai (2020). Additionally, it was found that the birds from one of the investigated pullet flocks were not vaccinated against IBD. This could also clarify the reason for the exceptionally elevated mortality rate of IBD in pullets especially in Flock N°10.

Even though flock N°11 received vaccine against IBD, it still contracted the virus. This can be attributed to vaccine failure due to an inadequacy between the circulating viral strain, which in this case was the vv strain, and the vaccine strain that was administered, which was an intermediate strain. As a result, mild vaccines are not very effective against vvIBDV, as stated by Thomrongsuwannakij *et al.* (2021). Indeed, the characteristic of vvIBDVs is their ability to cause disease in the presence of high levels of maternal antibodies (MDAs) (Berg, 2000; Tolba *et al.*, 2019).

The moderate recorded mortalities, in affected broiler flocks, could suggest that they were infected by classical IBDV strain. In the same context, it has been reported that mortality associated with infection due to classic strains may range from 1-30% (Müller *et al.*, 2003; Mawgod *et al.*, 2014). In contrast, the variant strain cannot be involved in the outbreaks of the present study because it does not produce overt clinical signs, but causes immunosuppression and may cause mortality due to secondary opportunistic infections (Kegne and Chanie, 2014).

On the other hand, the age at the time of the outbreaks was similar to the information reported in the literature. Clinical disease resulting from vvIBDV

infection is typically seen in chicks between 3-6 weeks old, which coincides with the period of maximal development of the bursa of Fabricius (BF), as observed with classical pathogenic strains, according to Mahgoub *et al.* (2012).

The main necropsy findings are in line with previous field studies, as reported by Khenenou *et al.* (2017) and Umm-i-Habiba *et al.* (2020). In post-mortem examination, bursa of Fabricius is the principal diagnostic organ for birds that died during the acute phase of vvIBD. At the macroscopic level, BF appears swollen, edematous, and sometimes hemorrhagic. Within 7-10 days, the BF becomes atrophic, as noted by Ingraio *et al.* (2013).

No bursal atrophy was found in the present study, indicating that the disease had started recently because bursal atrophy is detected only in advanced cases of IBD (Wani *et al.*, 2021). According to Bejo *et al.* (2004), the BF undergoes atrophy as a result of the progression of lymphoid cell degeneration and necrosis during the later stage of the infection.

Post-mortem findings did not differ markedly between infections with vvIBDV and classical virulent strains, such as F52/70, except that hemorrhaging in the bursae and other tissues may be more extensive and frequent in vvIBDV infections. Additionally, the disease may be more pronounced, acute, and associated with high mortality (Ignjatovic, 2004; Ingraio *et al.*, 2013).

The histopathological changes observed in the bursa of Fabricius, including lymphoid follicle depletion, were consistent with previous reports of vvIBDV infection (Omer and Khalafalla, 2022; Tanimura, 2022). The depletion of lymphoid B cells in the BF following IBDV infection is attributed to both necrosis and apoptosis, as noted by Ingraio *et al.* (2013).

The bursa is the preferred tissue for assessing microscopic changes. In addition, the literature does not indicate a significant difference between the microscopic lesions of the BF caused by hypervirulent and classical IBDVs (Ignjatovic, 2004).

According to Lukert and Saif (2003), and Mahgoub *et al.* (2012), degeneration and necrosis of lymphocytes starts in the medullary area of the bursal follicles as early as 1 dpi. Then, lymphocytes are replaced by heterophils of pyknotic debris and hyperplastic reticuloendothelial cells. According to the same authors, by days 3 or 4 post-infection, all lymphoid follicles are affected. Severe oedema, hyperaemia, and marked accumulation of heterophils are evident, which causes an increased bursal weight.

According to Ignjatovic's in 2004, chicks infected with classical IBDV strains that have low pathogenicity show regeneration of the bursa, characterized by the repopulation of lymphocytes, within 8-21 days after infection. In contrast, chicks infected with vvIBDV do not exhibit a recovery phase, and instead,

chronic lesions develop in their bursae three weeks after infection.

Using RT-PCR, the IBDV was detected in 54.5 % of the investigated chicken flocks. This rate is consistent with the findings reported by Boudaoud in 2015 (46.15%) and Abed *et al.* in 2018 (63%).

The VP2 gene is frequently used to detect IBDV in field samples using RT-PCR because of its high specificity to the virus, and as a result, it is commonly used to differentiate and classify IBDV isolates by researchers (Jackwood and Sommer-Wagner, 2007; Adamu *et al.*, 2013; Awandkar *et al.*, 2018). Additionally, the VP2 protein is known to play a critical role in the pathogenicity, virulence, and tropism of the virus, as noted by Cheggag *et al.* (2021).

The hypervariable region of VP2, spanning amino acids 206-350, contains two major hydrophilic domains known as major hydrophilic peaks A (amino acids 212-224) and B (amino acids 314-325), which form hairpin loops PBC (amino acids 219-224) and PHI (amino acids 316-324), respectively (Azad *et al.*, 1987, Bayliss *et al.*, 1990; Garriga *et al.*, 2006; Mahgoub *et al.*, 2012). The minor hydrophilic peaks 1 (aa 248-254) and peak 2 (aa 279-290) of hVP2 form loops PDE (aa 249-254) and PFG (aa 279-284), respectively (Coulibaly *et al.*, 2010).

The studied strains were found to contain four conserved amino acids (222A, 256I, 294I, and 299S) that are distinctive of vvIBDV, as reported in previous research (Brown and Skinner, 1996; Yilmaz *et al.*, 2019), as shown in Figure 7.

As reported by other authors (Ndashe *et al.*, 2016; Drissi Touzani *et al.*, 2019; Yilmaz *et al.*, 2019), certain conserved residues (A222, I242, Q253, I256, D279, A284, I294, and S299) are considered characteristic of vvIBDV. Our isolate's amino acid sequence analysis, as presented in Table 4, corroborates these findings.

In addition, our isolates exhibited the amino acid Q249, which has been detected in numerous vvIBDV strains (Lachheb *et al.*, 2021). The residues I272, M290, Q324, and S330 found in our study's isolates are also frequently observed and distinctive of vvIBDV strains, as stated in prior research (Hernández *et al.*, 2006; Abed *et al.*, 2018).

According to previous studies (Yamaguchi *et al.*, 1996; Brandt *et al.*, 2001; Mahgoub *et al.*, 2012), the presence of both amino acids 279D and 284A in our Algerian strains determines their virulent phenotype.

In addition, glutamine (Q) at aa position 253, aspartic acid (D) at aa position 279, and alanine (A) at aa position 284 have been identified as the putative amino acids responsible for virulence and cellular tropism in several studies (Mundt, 1999; Brandt *et al.*, 2001; Mwenda *et al.*, 2018).

The two strains analyzed in this study were found to contain the heptapeptide sequence 'SWSASGS' rich in serine, which is adjacent to the second major hydrophilic region. This sequence is commonly associated with virulent strains of IBD, as noted by previous studies conducted by Brown *et al.* (1994), Hernández *et al.* (2006), Felice *et al.* (2017), and Alkhalefa *et al.* (2019). Additionally, Lachheb *et al.* (2021) reported that the most virulent strains were those with the region with the highest number of serine residue. Moreover, the absence of aa 249R in the studied isolates, characteristic of attenuated IBDV strains (Gómez *et al.*, 2018), confirmed their virulent phenotype.

Unlike variant viruses which typically lack aa 222T and 254S as noted in a previous study by Heine *et al.* (1991), these amino acid residues were present in the strains analysed in this study. This indicates that there was no antigenic drift observed among these strains. Additionally, variant strains of IBDV are known to cause immunosuppression (due to early and severe atrophy of the BF) and a reduction in production performance, even though they don't cause obvious clinical signs (Kegne and Chanie, 2014; Zachar *et al.*, 2016; Xu *et al.*, 2020).

The strains analysed in this study were found to be very similar to the Algerian hypervirulent strains that were previously identified by Boudaoud in 2015, namely 03A1g, 09A1g, 20A1g, 38A1g, and 50A1g, as well as the strain 399 Algeria reported by Michel and Jackwood in 2017. Additionally, they were almost indistinguishable (99.28-100%) from the hypervirulent and reassortant strains reported in Algeria in 2018 by Abed *et al.* (2018), specifically strains 150124, 150128, 150133, 150142, and 150144.

Based on the phylogenetic tree, it was observed that our two studied strains (MBechIBDVdz1 and MBechIBDVdz2) were closely related to previously isolated Algerian vvIBDVs, and they were grouped together in a cluster.

The initial appearance of IBD in poultry production in Algeria occurred after the virus surfaced in Europe during the late 1980s, as noted by Allamigeon and Comte (2001). In (2015), Boudaoud identified a vvIBDV strain in the eastern region of Algeria. Recently, Abed *et al.* (2018) conducted a study that confirmed the circulation of IBDVs within the country. Based on genetic analyses of partial sequences for segments A and B, the research identified four groups of Algerian IBDV isolates: i) viruses related to vvIBDV for segments A and B; ii) viruses, 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, with segment A genetically related to vvIBDV and segment B of undetermined origin.

vvIBDVs have also been reported in countries neighbouring Algeria. As per Cheggag *et al.* (2021), nearly 40% of the IBDVs that were in circulation in

Morocco from 2013 to 2016 were highly virulent strains. According to Lachheb and colleagues (2021), their research on Tunisian IBDV strains showed that the isolates from this country are closely related to Algerian vvIBDV strains based on phylogenetic analyses of the five gene sequences. In contrast, Moroccan strains, despite being in close geographical proximity, were found to be less closely related and were not on the same tree branch.

According to Drissi Touzani *et al.* (2020), segment A of Moroccan IBDV isolates was phylogenetically related to Algerian and Tunisian vvIBDV isolates, which is likely due to the close geographical proximity and transboundary between Morocco and its neighboring countries. However, in the phylogeny of segment B, Moroccan IBDV isolates were found to be more closely related to French and Malaysian isolates, as reported by the same authors.

Conclusion: IBDV was detected in 6 out of the 11 chicken flocks investigated using RT-PCR. Additionally, sequencing revealed the presence of vvIBDV in two out of the six IBDV-positive flocks.

Because of the vaccination failures they generate, special attention should be paid to these highly virulent strains, which continue to spread in Algeria. This necessitates considering a more effective vaccination strategy, selecting the most appropriate vaccine strains against the circulating pathotypes of IBD, and implementing continuous epidemiological surveillance.

Acknowledgements: The authors gratefully acknowledge Husam Bakri and Entisar Al-Hallaq (Jordan experts in poultry management and PCR, respectively) for providing the facilitation and technical assistance throughout the study.

Authors' Contributions: M.B., K.O.B., and M.O conceived and designed research. M.B. conducted experiments. M.B., A.L., and O.M. analyzed data. M.B. wrote the manuscript. All authors interpreted the data and approved the final version.

Competing Interests: The authors declare that there is no conflict of interest.

REFERENCES

- Abdel-Alim, G. A., M. H. H. Awaad, and Y. M. Saif (2003). Characterization of Egyptian Field Strains of Infectious Bursal Disease Virus. *Avian Dis* 47(4):1452–1457. DOI: <http://dx.doi.org/10.1637/7032>
- Abed, M., S. Soubies, C. Courtillon, F.-X. Briand, C. Allée, M. Amelot, C. De Boisseson, P. Lucas, Y. Blanchard, A. Belahouel, R. Kara, A. Essalhi, S. Temim, D. Khelef, and N. Eterradosi (2018). Infectious bursal disease virus in Algeria: Detection of highly pathogenic reassortant viruses. *Infect Genet. Evol* 60:48–57. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.01.029>
- Adamu, J., A. A. Owoade, P. A. Abdu, H. M. Kazeem, and M. Y. Fatihu (2013). Characterization of field and vaccine infectious bursal disease viruses from Nigeria revealing possible virulence and regional markers in the VP2 minor hydrophilic peaks. *Avian. Pathol* 42(5):420–433. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/03079457.2013.822055>
- Ali Khan, R. S., M. Habib, W. Ali, M. Salah Ud Din Shah, A. Ashraf, Z. Ali Tahir, Z. H. Helal, M. I. Khan, S. Mahboob, K. A-Al-Ghanim, and F. Al-Misned (2019). Phylogenetic analysis of Infectious Bursal Disease viruses according to newly proposed model of classification into geno-groups. *J. Infect. Public. Health* 12(3):410–418. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2018.12.012>
- Alkhalefa, N., M. El-Abasy, S. Kasem, and E. Abu El-Naga (2019). Molecular characterisation of infectious bursal disease virus (IBDV) isolated from commercial broiler chickens in Nile Delta. *Bulg. J. Vet. Med* 22(4):399–408. DOI: 10.15547/bjvm.2133
- Allamigeon, M.F., and S. Comte (2001). Identification de virus hypervirulents de la maladie de Gumboro au Maghreb. *Afr. Agric* 292(Mai): 82–83.
- Amin, O. G. M., and D. J. Jackwood (2014). Identification and molecular analysis of infectious bursal disease in broiler farms in the Kurdistan Regional Government of Iraq. *Trop. Anim. Health. Prod* 46(7):1297–1301. DOI 10.1007/s11250-014-0643-0
- Awandkar, S. P., P. A. Tembhrne, J. A. Kesharkar, N. V. Kurkure, S. P. Chaudhari, S. W. Bonde, and V. C. Ingle (2018). Identification and characterization of a novel infectious bursal disease virus from outbreaks in Maharashtra Province of India. *Vet. World* 11(10):1516–1525. DOI: 10.14202/vetworld.2018.1516-1525
- Azad, A. A., N. Jagadish, M. A. Brown, and P. J. Hudson (1987). Deletion Mapping and Expression in *Escherichia coli* of the Large Genomic Segment of a Birnavirus. *Virology* 161(1):145-152. DOI: 10.1016/0042-6822(87)90180-2.
- Bayliss, C. D., U. Spies, K. Shaw, R. W. Peters, A. Papageorgiou, H. Muller, and M. E. G. Boursnell (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(6):1303–1312. DOI: 10.1099/0022-1317-71-6-1303.
- Becheur, M., M. Oumouna (2019). Détermination de la date optimale de vaccination contre la maladie de Gumboro chez des poulets de chair élevés dans une région de l'Algérie et utilisant un vaccin vivant intermédiaire plus. In: *Proceeding des 14^{èmes} Journées Internationales en Sciences Vétérinaires, ENSV d'Alger, Algiers., 9h30*.
- Bejo, H., L. W. Tee, and U. Chulan (2004). Response of gut associated lymphoid tissue of chickens (GALT) to very virulent IBD virus of Malaysian isolate. *J. Anim. Vet. Adv* 3(3): 142-147. DOI: <https://medwelljournals.com/abstract/?doi=javaa.2004.142.147>
- Berg, T. P. V. D (2000). Acute infectious bursal disease in poultry: A review. *Avian. Pathol* 29(3):175–194. DOI: 10.1080/03079450050045431.
- van den Berg, T. P., D. Morales, N. Eterradosi, G. Rivallan, D. Toquin, R. Raue, K. Zierenberg, M. F. Zhang, Y. P. Zhu, C. Q. Wang, H. J. Zheng, X. Wang, G. C. Chen, B. L. Lim, and H. Müller (2004). Assessment of genetic, antigenic and pathotypic criteria for the characterization of IBDV strains. *Avian Pathology* 33(5):470–476. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/03079450400003650>
- Bidin, Z., I. Lojkić, M. Grce, and B. Pokrić (2001). Differentiation of infectious bursal disease virus strains at a genomic level. *Vet. arhiv* 71(6):325-336.
- Bouadoud, A., and N. Alloui (2008). Evaluation de l'innocuité de vaccins à virus vivants atténués contre la bursite infectieuse (maladie de Gumboro) chez le poussin de chair conventionnel. *Rev. - Off. Int. Epizoot* 27(3):793–802. DOI:10.20506/rst.27.3.1844
- Bouadoud, A (2015). Caractérisation moléculaire des virus sauvages de la maladie de Gumboro. Thèse de Doctorat, Institut des Sciences Vétérinaires et des Sciences Agronomiques, Université de Batna 1, Algérie.
- Brandt, M., K. Yao, M. Liu, R. A. Heckert, and V. N. Vakharia (2001). Molecular Determinants of Virulence, Cell Tropism, and Pathogenic Phenotype of Infectious Bursal Disease Virus. *J. Virol* 75(24):11974–11982. DOI: 10.1128/JVI.75.24.11974–11982.2001
- Brown Jordan, A., V. Gongora, D. Hartley, and C. Oura (2018). A Review of Eight High-Priority, Economically Important Viral Pathogens of Poultry within the Caribbean Region. *Vet. Sci* 5(1):14. doi:10.3390/vetsci5010014
- Brown, M. D., P. Green, and M. A. Skinner (1994). VP2 sequences of recent European “very virulent” isolates of infectious bursal disease virus are closely related to each other but are distinct from those of “classical” strains. *J. Gen. Virol* 75(3):675–680. DOI: 10.1099/0022-1317-75-3-675.
- Brown, M. D., and M. A. Skinner (1996). Coding sequences of both genome segments of a European ‘very virulent’ infectious bursal disease virus. *Virus Res* 40(1):1–15. DOI: 10.1016/0168-1702(95)01253-2.
- Cheggag, M., K. Zro, M. Mouahid, M. El Houadfi, G. Sebbar, and F. Kichou (2021). Profil moléculaire et épidémiologique du virus de la bursite infectieuse aviaire circulant au Maroc entre 2013 et 2016. *Rev. Mar. Sci. Agron. Vét* 9(3):429-433.
- Coulibaly, F., C. Chevalier, B. Delmas, and F. A. Rey (2010). Crystal Structure of an Aquabimavirus Particle: Insights into Antigenic Diversity and Virulence Determinism. *J. Virol* 84(4):1792–1799. DOI:10.1128/JVI.01536-09
- 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(2):593–605. DOI: 10.1128/JVI.32.2.593-605.1979.
- Drissi Touzani, C., S. Fellahi, O. Fassi Fihri, F. Gaboun, S. Khayi, R. Mentag, C. Lico, S. Baschieri, M. El Houadfi, and M. Ducatez (2020). Complete genome analysis and time scale evolution of very virulent infectious bursal disease viruses isolated from recent outbreaks in Morocco. *Infect Genet. Evol* 77:104097. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.104097>
- Drissi Touzani, C., S. Fellahi, F. Gaboun, O. Fassi Fihri, S. Baschieri, R. Mentag, and M. El Houadfi (2019). Molecular characterization and phylogenetic analysis of very virulent infectious bursal disease virus circulating in Morocco during 2016-2017. *Arch. Virol* 164(2):381–390. DOI: 10.1007/s00705-018-4076-3
- Eterradosi, N., and Y. M. Saif (2013). Infectious Bursal Disease. Pages 219–246 in D. E. Swayne, editor. *Diseases of Poultry*. First edition. Wiley. U.S.A.
- Eterradosi, N., and Y. M. Saif (2020). Infectious Bursal Disease. Pages 257–283 in D. E. Swayne, M. Boulianne, C. M. Logue, L. R. McDougald, V. Nair, D. L. Suarez, S. Wit, T. Grimes, D. Johnson, M. Kromm, T. Y. Prajitno, I. Rubinoff, and G. Zavala, editors. *Diseases of Poultry*. First edition. Wiley. U.S.A
- FAOSTAT (2023). Statistics of Food and Agriculture Organization of the United Nations. <https://www.fao.org/faostat/fr/#data> Accessed 27 March 2023.

- Felice, V., G. Franzo, E. Catelli, A. Di Francesco, M. Bonci, M. Cecchinato, G. Mescolini, D. Giovanardi, P. Pesente, and C. Lupini (2017). Genome sequence analysis of a distinctive Italian infectious bursal disease virus. *Poult. Sci* 96(12):4370–4377. DOI: <http://dx.doi.org/10.3382/ps/pex278>
- Garriga, D., J. Querol-Audí, F. Abaitua, I. Saugar, J. Pous, N. Verdaguer, J. R. Castón, and J. F. Rodríguez (2006). The 2.6-Angstrom Structure of Infectious Bursal Disease Virus-Derived T=1 Particles Reveals New Stabilizing Elements of the Virus Capsid. *J. Virol* 80(14):6895–6905. DOI:10.1128/JVI.00368-06
- Gómez, E., M. S. Lucero, M. Richetta, S. Chimeno Zoth, and A. Berinstein (2018). Infectious Bursal Disease Virus. Pages 169–187 in J. MacDonald, editor. *Prospects of Plant-Based Vaccines in Veterinary Medicine*. Springer International Publishing, Cham. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-319-90137-4_7
- Heine, H.-G., M. Haritou, P. Failla, K. Fahey, and A. Azad (1991). Sequence Analysis and Expression of the Host-protective Immunogen VP2 of a Variant Strain of Infectious Bursal Disease Virus Which Can Circumvent Vaccination with Standard Type I Strains. *J. Gen. Virol* 72(8):1835–1843. DOI: <https://doi.org/10.1099/0022-1317-72-8-1835>
- Hernández, M., A. Banda, D. Hernández, F. Panzera, and R. Pérez (2006). Detection of Very Virulent Strains of Infectious Bursal Disease Virus (vvIBDV) in Commercial Broilers from Uruguay. *Avian Dis* 50(4):624–631. DOI: <http://dx.doi.org/10.1637/7530-032306R1.1>
- Hitchner, S. B. (1970). Infectivity of infectious bursal disease virus for embryonating eggs. *Poultry science*, 49(2): 511-516. DOI: <https://doi.org/10.3382/ps.0490511>
- Hudson, P.J., N.M. Mckern, B.E. Power, and A.A. Azad (1986). Genomic structure of the large RNA segment of infectious bursal disease virus. *Nucleic Acids Res* 14(12):5001-5002. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/14.12.5001>
- Ignjatovic, J. (2004). Very virulent infectious bursal disease virus. Australia and New Zealand Standard Diagnostic Procedures. 6.
- Ingrao, F., F. Rauw, B. Lambrecht, and T. van den Berg (2013). Infectious Bursal Disease: A complex host–pathogen interaction. *Dev. Comp. Immunol* 41(3):429–438. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.dci.2013.03.017>
- Islam, M. N., S. M. H. Rashid, M. F. Hoque, M. S. B. Juli, and M. Khatun (2008). Pathogenicity of IBVD related to outbreaks in the vaccinated flocks and the causes of vaccination failure. *J. innov. dev. Strategy* 2(3):22-30.
- Jackwood, D. J., K. A. Schat, L. O. Michel, and S. de Wit (2018). A proposed nomenclature for infectious bursal disease virus isolates. *Avian. Pathol* 47(6):576–584. DOI: <https://doi.org/10.1080/03079457.2018.1506092>
- Jackwood, D. J., and S. Sommer-Wagner (2007). Genetic characteristics of infectious bursal disease viruses from four continents. *Virology* 365(2):369–375. DOI:10.1016/j.virol.2007.03.046
- Jackwood, D. J., and R. J. Jackwood (1997). Molecular identification of infectious bursal disease virus strains. *Avian diseases* 41: 97-104. DOI: <https://doi.org/10.2307/1592448>
- Kegne, T., and M. Chanie (2014). Review on the Incidence and Pathology of Infectious Bursal Disease. *British J. Poultry Sci* 3(3): 68-77. DOI: 10.5829/idosi.bjps.2014.3.3.8556
- Khenenou, T., M. Bougherara, M. Melizi, and R. Lamraoui (2017). Histomorphological Study of the Bursae of Fabricius of Broiler Chickens during Gumboro Disease in Algeria Area. *Glob. Vet* 18(2): 132-136. DOI: 10.5829/idosi.gv.2017.132.136
- Lachheb, J., A. Jbenyeni, J. Nsiri, I. Larbi, F. Ammouna, I. El behi, and A. Ghram (2021). Full-length genome sequencing of a very virulent infectious bursal disease virus isolated in Tunisia. *Poult. Sci* 100(2):496–506. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.11.035>
- Lukert, P. D., and Y. M. Saif (2003). Infectious Bursal Disease. In: Saif YM, Barnes HJ, Fadly AM, Glisson JR, McDougald LR, Swayne DE. *Diseases of poultry*, 11th edition, Iowa State press, a Blackwell Publishing Company.
- Luna, L.G. (1968). *Manual of Histologic staining methods of the armed forces*. Institute of Pathology, 3rd edition. New York, Mc Graw Hill Book Company, New York.
- Mahgoub, H. A., M. Bailey, and P. Kaiser (2012). An overview of infectious bursal disease. *Arch. Virol* 157(11):2047–2057. DOI 10.1007/s00705-012-1377-9
- Mató, T., T. Tatár-Kis, B. Felföldi, D. S. Jansson, Z. Homonnay, K. Bányai, and V. Palya (2020). Occurrence and spread of a reassortant very virulent genotype of infectious bursal disease virus with altered VP2 amino acid profile and pathogenicity in some European countries. *Vet. Microbiol* 245:108663. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2020.108663>
- Mawgod, S. A., A. S. Arafa, and H. A. Hussein (2014). Molecular genotyping of the infectious bursal disease virus (IBDV) isolated from Broiler

- Flocks in Egypt. *Int. J. Vet. Sci* 2(1):46–52. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijvsm.2014.02.004>
- McFerran, J. B., M. S. McNulty, E. R. McKillop, T. J. Connor, R. M. McCracken, D. S. Collins, and G. M. Allan (1980). Isolation and serological studies with infectious bursal disease viruses from fowl, turkeys and ducks: Demonstration of a second serotype. *Avian. Pathol* 9(3):395–404. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/03079458008418423>
- Michel, L. O., and D. J. Jackwood (2017). Classification of infectious bursal disease virus into genogroups. *Arch. Virol* 162(12):3661–3670. DOI: [10.1007/s00705-017-3500-4](https://doi.org/10.1007/s00705-017-3500-4)
- Morgan, M. M., I. G. Macreadie, V. R. Harley, P. J. Hudson, and A. A. Azad (1988). Sequence of the small double-stranded RNA genomic segment of infectious bursal disease virus and its deduced 90-kDa product. *Virology* 163(1):240–242. DOI: [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(88\)90258-9](https://doi.org/10.1016/0042-6822(88)90258-9)
- Moscoco, H., I. Alvarado, and C. L. Hofacre (2006). Molecular Analysis of Infectious Bursal Disease Virus from Bursal Tissues Collected on FTA® Filter Paper. *Avian. Dis* 50(3):391–396. DOI: <http://dx.doi.org/10.1637/7505-011306R.1>
- Müller, H., Md. R. Islam, and R. Raue (2003). Research on infectious bursal disease—the past, the present and the future. *Vet. Microbiol* 97(1–2):153–165. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2003.08.005>
- Müller, H., E. Mundt, N. Eterradossi, and M. R. Islam (2012). Current status of vaccines against infectious bursal disease. *Avian. Pathol* 41(2):133–139. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/03079457.2012.661403>
- 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(8):2067–2076. DOI: <https://doi.org/10.1099/0022-1317-80-8-2067>
- Mundt, E., J. Beyer, and H. Muller (1995). Identification of a novel viral protein in infectious bursal disease virus-infected cells. *J. Gen. Virol* 76(2):437–443. DOI: <https://doi.org/10.1099/0022-1317-76-2-437>
- Mwenda, R., K. Changula, B. M. Hang'ombe, N. Chidumayo, A. S. Mangani, T. Kaira, A. Takada, A. S. Mweene, and E. Simulundu (2018). Characterization of field infectious bursal disease viruses in Zambia: evidence of co-circulation of multiple genotypes with predominance of very virulent strains. *Avian. Pathol* 47(3):300–313. DOI: <https://doi.org/10.1080/03079457.2018.1449941>
- Ndashe, K., E. Simulundu, B. M. Hang'ombe, L. Moonga, H. Ogawa, A. Takada, and A. S. Mweene (2016). Molecular characterization of infectious bursal disease viruses detected in vaccinated commercial broiler flocks in Lusaka, Zambia. *Arch. Virol* 161(3):513–519. DOI: [10.1007/s00705-015-2690-x](https://doi.org/10.1007/s00705-015-2690-x)
- Omer, M., and A. Khalafalla (2022). Epidemiology and Laboratory Diagnosis of Severe Infectious Bursal Disease in Vaccinated Chickens in Khartoum, Sudan. *Open Vet. J* 12(1):33. DOI: [10.5455/OVJ.2022.v12.i1.5](https://doi.org/10.5455/OVJ.2022.v12.i1.5)
- Qin, Y., and S. Zheng (2017). Infectious Bursal Disease Virus-Host Interactions: Multifunctional Viral Proteins that Perform Multiple and Differing Jobs. *Int. J. Mol. Sci* 18(1):161. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms18010161>
- Rajkhowa, T. K., C. Vanlalruati, and R. S. Arya (2018). Genetic Characterization of Infectious Bursal Disease Viruses from Field Outbreaks of the North East Region of India. *Avian. Dis* 62(2):218. DOI: <https://doi.org/10.1637/11810-021118-Reg.1>
- Sharma, J. M., J. E. Dohms, and A. L. Metz (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(1):112. DOI: <https://doi.org/10.2307/1591076>
- Shekhar, S., and N. Dalai (2020). A Review on Infectious Bursal Disease - Major Concern in Poultry. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci* 9(6):535–541. DOI: <https://doi.org/10.20546/ijemas.2020.906.069>
- Silva, M. S. e, D. R. Rissi, and D. E. Swayne (2016). Very Virulent Infectious Bursal Disease Virus Produces More-Severe Disease and Lesions in Specific-Pathogen-Free (SPF) Leghorns Than in SPF Broiler Chickens. *Avian. Dis* 60(1):63–66. DOI: <http://dx.doi.org/10.1637/11230-070615-ResNote.1>
- Spackman, E., C. B. Stephens, and M. J. Pantin-Jackwood (2017). The Effect of Infectious Bursal Disease Virus-Induced Immunosuppression on Vaccination Against Highly Pathogenic Avian Influenza Virus. *Avian. Dis* 62(1):36. DOI: <https://doi.org/10.1637/11769-110717-Reg.1>
- Tanimura, N (2022). Pathological Changes and Pathogenic Mechanisms of Infectious Bursal Disease (IBD) in Chickens Infected with IBD Viruses of Different Pathogenicities. *Jpn. Agric. Res. Q: JARQ* 56(1):33–40. DOI: [10.6090/jarq.56.33](https://doi.org/10.6090/jarq.56.33)

- Thai, T. N., I. Jang, H.-A. Kim, H.-S. Kim, Y.-K. Kwon, and H.-R. Kim (2021). Characterization of antigenic variant infectious bursal disease virus strains identified in South Korea. *Avian. Pathol* 50(2):174–181. DOI: <https://doi.org/10.1080/03079457.2020.1869698>
- Thomrongsuwannakij, T., N. Charoenvisal, and N. Chansiripornchai (2021). Comparison of two attenuated infectious bursal disease vaccine strains focused on safety and antibody response in commercial broilers. *Vet. World* 14(1):70–77. DOI: www.doi.org/10.14202/vetworld.2021.70-77
- Tolba, H. M. N., N. F. S. Awad, G. K. F. Kotb, and A. Adel (2019). Molecular Diagnosis of Persistently Very Virulent Infectious Bursal Disease Virus at Sharkia Governorate, Egypt. *Hosts and Viruses* 6(3). DOI: <http://dx.doi.org/10.17582/journal.hv/2019/6.3.4.2.49>
- Umm-i-Habiba, U.-H., A. Maqbool, M. Safdar, N. Zia, A. Mehmood, M. Usman, M. Sharif, A. Khan, and S. Umar (2020). Detection and Phylogeny of Infectious Bursal Disease Virus (IBDV) during Field Outbreaks in Broilers. *Pakistan J. Zool* 52(2). DOI: <https://dx.doi.org/10.17582/journal.pjz/20190210070218>
- Vakharia, V.N., J. He, B. Ahamed, and D.B. Snyder (1994). Molecular basis of antigenic variation in infectious bursal disease virus. *Virus Res* 31(2):265-273. DOI: [https://doi.org/10.1016/0168-1702\(94\)90009-4](https://doi.org/10.1016/0168-1702(94)90009-4)
- Wagari, A (2021). A review on infectious bursal disease in poultry. *Health. Econ. Outcome. Res. Open Access* 7(2):18-23.
- Wani, B.M., M.M. Darzi, S.A., Kamil, S. Shah, S. Adil, T. Ayaşan (2021). Gross, histopathological, histoenzymatic and histochemical studies on infectious bursal disease in broiler chickens. *J. Anim. Plant Sci* 31(1):36-45. DOI: <https://doi.org/10.36899/JAPS.2021.1.0190>
- Xu, A., Y. Pei, K. Zhang, J. Xue, S. Ruan, and G. Zhang (2020). Phylogenetic analyses and pathogenicity of a variant infectious bursal disease virus strain isolated in China. *Virus Res* 276:197833. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2019.197833>
- Yamaguchi, T., M. Ogawa, Y. Inoshima, M. Miyoshi, H. Fukushi, and K. Hirai (1996). Identification of Sequence Changes Responsible for the Attenuation of Highly Virulent Infectious Bursal Disease Virus. *Virology* 223(1):219–223. DOI: <https://doi.org/10.1006/viro.1996.0470>
- Yilmaz, A., N. Turan, E. Bayraktar, A. Gurel, U. Y. Cizmecigil, O. Aydin, O. E. Bamac, M. Cecchinato, G. Franzo, H. E. Tali, B. Cakan, V. Savic, J. A. Richt, and H. Yilmaz (2019). Phylogeny and evolution of infectious bursal disease virus circulating in Turkish broiler flocks. *Poult. Sci* 98(5):1976–1984. DOI: <http://dx.doi.org/10.3382/ps/pey551>
- Zachar, T., S. Popowich, B. Goodhope, T. Knezacek, D. Ojkic, P. Willson, K. A. Ahmed, and S. Gomis (2016). A 5-year study of the incidence and economic impact of variant infectious bursal disease viruses on broiler production in Saskatchewan, Canada. *Can. J. Vet Res* 80(4): 255-261.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. FAOSTAT 2023 [Internet]. [cité 2024 sept 9]; Available from: <https://www.fao.org/faostat/fr/#data>
2. Eterradossi N, Saif Y. Infectious bursal disease virus. *Dis Poult* 2020;257-83.
3. Hitchner SB. Infectivity of Infectious Bursal Disease Virus for Embryonating Eggs. *Poult Sci* 1970;49(2):511-6.
4. Spackman E, Stephens CB, Pantin-Jackwood MJ. The effect of infectious bursal disease virus-induced immunosuppression on vaccination against highly pathogenic avian influenza virus. *Avian Dis* 2018;62(1):36-44.
5. Brown Jordan A, Gongora V, Hartley D, Oura C. A Review of Eight High-Priority, Economically Important Viral Pathogens of Poultry within the Caribbean Region. *Vet Sci* 2018;5(1):14.
6. Dobos P, Hill BJ, Hallett R, Kells DT, Becht H, Teninges D. Biophysical and biochemical characterization of five animal viruses with bisegmented double-stranded RNA genomes. *J Virol* [Internet] 1979 [cité 2024 sept 9]; Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/jvi.32.2.593-605.1979>
7. Müller H, Islam MR, Raue R. Research on infectious bursal disease—the past, the present and the future. *Vet Microbiol* 2003;97(1-2):153-65.
8. Jackwood DJ, Jackwood RJ. Molecular identification of infectious bursal disease virus strains. *Avian Dis* 1997;97-104.
9. McFerran JB, McNulty MS, McKillop ER, Connor TJ, McCracken RM, Collins DS, et al. Isolation and serological studies with infectious bursal disease viruses from fowl, turkeys and ducks: Demonstration of a second serotype. *Avian Pathol* 1980;9(3):395-404.
10. Sharma JM, Dohms JE, Metz AL. 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* 1989;112-24.
11. van den Berg TP, Morales D, Eterradossi N, Rivallan G, Toquin D, Raue R, et al. Assessment of genetic, antigenic and pathotypic criteria for the characterization of IBDV strains. *Avian Pathol* 2004;33(5):470-6.
12. Jackwood DJ, Schat KA, Michel LO, de Wit S. A proposed nomenclature for infectious bursal disease virus isolates. *Avian Pathol* 2018;47(6):576-84.
13. Mawgod SA, Arafa AS, Hussein HA. Molecular genotyping of the infectious bursal disease virus (IBDV) isolated from Broiler Flocks in Egypt. *Int J Vet Sci Med* 2014;2(1):46-52.
14. Vakharia VN, He J, Ahamed B, Snyder DB. Molecular basis of antigenic variation in infectious bursal disease virus. *Virus Res* 1994;31(2):265-73.
15. Rajkhowa TK, Vanlalruati C, Arya RS. Genetic characterization of infectious bursal disease viruses from field outbreaks of the North East Region of India. *Avian Dis* 2018;62(2):218-25.

16. Berg TPVD. Acute infectious bursal disease in poultry: A review. *Avian Pathol* 2000;29(3):175-94.
17. Eterradossi N, Saif YM. Infectious Bursal Disease In: *Diseases of Poultry*, Swayne DE, JR Glisson, LR McDougald, LK Nolan, DL Suarez and V Nair, eds. 2013;
18. Abdel-Alim GA, Awaad MHH, Saif YM. Characterization of Egyptian field strains of infectious bursal disease virus. *Avian Dis* 2003;47(4):1452-7.
19. MacDonald J, éditeur. *Prospects of Plant-Based Vaccines in Veterinary Medicine* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2018 [cité 2024 sept 10]. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-90137-4>
20. Müller H, Mundt E, Eterradossi N, Islam MR. Current status of vaccines against infectious bursal disease. *Avian Pathol* 2012;41(2):133-9.
21. Thomrongsuwannakij T, Charoenvisal N, Chansiripornchai N. Comparison of two attenuated infectious bursal disease vaccine strains focused on safety and antibody response in commercial broilers. *Vet World* 2021;14(1):70.
22. Islam MN, Rashid SMH, Hoque MF, Juli MSB, Khatun M. Pathogenicity of IBDV related to outbreaks in the vaccinated flocks and the causes of vaccination failure. *J Innov Dev Strategy* 2008;2(3):22-30.
23. Becheur M, Oumouna M. Détermination de la date optimale de vaccination contre la maladie de Gumboro chez des poulets de chair élevés dans une région de l'Algérie et utilisant un vaccin vivant intermédiaire plus. In: *Proceeding*. Alger: ENV Alger; 2019.
24. Allamigeon MF, Comte S. Identification de virus hypervirulents de la maladie de Gumboro au Maghreb. *Afr Agric* 2001;292:82-3.
25. Boudaoud A, Alloui N. Évaluation de l'innocuité de vaccins à virus vivants atténués contre la bursite infectieuse (maladie de Gumboro) chez le poussin de chair conventionnel. *Rev Sci Tech Int Epiz* 2008;27(3):793-802.
26. Boudaoud A. Caractérisation moléculaire des virus sauvages de la maladie de gumboro [Internet]. 2015 [cité 2024 sept 9]; Available from: <http://dspace.univ-batna.dz/handle/123456789/623>
27. Abed M, Soubies S, Courtillon C, Briand FX, Allée C, Amelot M, et al. Infectious bursal disease virus in Algeria: Detection of highly pathogenic reassortant viruses. *Infect Genet Evol* 2018;60:48-57.
28. Lukert PD, Saif YM. Infectious bursal disease, p 161–179. *Dis Poult* 11th Ed Iowa State Univ Press Ames IA 2003;
29. Macdonald RD. Immunofluorescent detection of double-stranded RNA in cells infected with reovirus, infectious pancreatic necrosis virus, and infectious bursal disease virus. *Can J Microbiol* 1980;26(2):256-61.
30. Müller H, Scholtissek C, Becht H. The genome of infectious bursal disease virus consists of two segments of double-stranded RNA. *J Virol* 1979;31(3):584-9.

31. Delmas B, Kibenge FSB, Leong JC, Mundt E, Vakharia VN, Wu JL. In Virus Taxonomy. Eighth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses: Birnaviridae. 2004;
32. Böttcher B, Kiselev NA, Stel'Mashchuk VY, Perevozchikova NA, Borisov AV, Crowther RA. Three-dimensional structure of infectious bursal disease virus determined by electron cryomicroscopy. *J Virol* 1997;71(1):325-30.
33. Gentile A. PATHOGENICITY OF A NEW ITALIAN GENOTYPE OF INFECTIOUS BURSAL DISEASE VIRUS IN SPF CHICKENS.
34. Mató T, Tatár-Kis T, Felföldi B, Jansson DS, Homonnay Z, Bányai K, et al. Occurrence and spread of a reassortant very virulent genotype of infectious bursal disease virus with altered VP2 amino acid profile and pathogenicity in some European countries. *Vet Microbiol* 2020;245:108663.
35. Morgan MM, Macreadie IG, Harley VR, Hudson PJ, Azad AA. Sequence of the small double-stranded RNA genomic segment of infectious bursal disease virus and its deduced 90-kDa product. *Virology* 1988;163(1):240-2.
36. Biđin Z, Lojkić I, Grce M, Čajavec S, Pokrić B. Differentiation of infectious bursal disease virus strains at a genomic level. *Vet Arh* 2001;71(6):325-36.
37. Mundt E, Beyer J, Muller H. Identification of a novel viral protein in infectious bursal disease virus-infected cells. *J Gen Virol* 1995;76(2):437-43.
38. Hudson PJ, McKern NM, Power BE, Azad AA. Genomic structure of the large RNA segment of infectious bursal disease virus. *Nucleic Acids Res* 1986;14(12):5001-12.
39. Qin Y, Zheng SJ. Infectious bursal disease virus-host interactions: multifunctional viral proteins that perform multiple and differing jobs. *Int J Mol Sci* 2017;18(1):161.
40. King AM, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ. Virus taxonomy. Ninth Rep Int Comm Taxon Viruses [Internet] 2012 [cité 2024 sept 9];9. Available from: https://www.researchgate.net/profile/Bradley-Hillman/publication/257958528_Family_Reoviridae/links/5e8f21ae92851c2f528d60e5/Family-Reoviridae.pdf
41. Dobos P. Protein-Primed RNA Synthesis *in Vitro* by the Virion-Associated RNA Polymerase of Infectious Pancreatic Necrosis Virus. *Virology* 1995;208(1):19-25.
42. Müller H, Nitschke R. The two segments of the infectious bursal disease virus genome are circularized by a 90,000-Da protein. *Virology* 1987;159(1):174-7.
43. Kibenge FSB, Dhama V. Evidence that virion-associated VP1 of avibirnaviruses contains viral RNA sequences. *Arch Virol* 1997;142(6):1227-36.
44. Spies U, Müller H, Becht H. Properties of RNA polymerase activity associated with infectious bursal disease virus and characterization of its reaction products. *Virus Res* 1987;8(2):127-40.
45. Cheggag M, Zro K, Mouahid M, Houadfi ME, Sebbar G, Kichou F. Profil moléculaire et épidémiologique du virus de la bursite infectieuse aviaire circulant au Maroc entre 2013 et

2016. Rev Marocaine Sci Agron Vét [Internet] 2021 [cité 2024 sept 9];9(3). Available from: https://agrimaroc.org/index.php/Actes_IAPH2/article/view/1017
46. Azad AA, Jagadish MN, Brown MA, Hudson PJ. Deletion mapping and expression in *Escherichia coli* of the large genomic segment of a birnavirus. *Virology* 1987;161(1):145-52.
 47. Bayliss CD, Spies U, Shaw K, Peters RW, Papageorgiou A, Müller H, et al. 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* 1990;71(6):1303-12.
 48. Garriga D, Querol-Audí J, Abaitua F, Saugar I, Pous J, Verdaguer N, et al. The 2.6-Angstrom Structure of Infectious Bursal Disease Virus-Derived T=1 Particles Reveals New Stabilizing Elements of the Virus Capsid. *J Virol* 2006;80(14):6895-905.
 49. Mahgoub HA. An overview of infectious bursal disease. *Arch Virol* 2012;157(11):2047-57.
 50. Coulibaly F, Chevalier C, Delmas B, Rey FA. Crystal Structure of an Aquabirnavirus Particle: Insights into Antigenic Diversity and Virulence Determinism. *J Virol* 2010;84(4):1792-9.
 51. Rage E, Marusic C, Lico C, Baschieri S, Donini M. Current state-of-the-art in the use of plants for the production of recombinant vaccines against infectious bursal disease virus. *Appl Microbiol Biotechnol* 2020;104(6):2287-96.
 52. Chevalier C, Lepault J, Da Costa B, Delmas B. The Last C-Terminal Residue of VP3, Glutamic Acid 257, Controls Capsid Assembly of Infectious Bursal Disease Virus. *J Virol* 2004;78(7):3296-303.
 53. Casañas A, Navarro A, Ferrer-Orta C, González D, Rodríguez JF, Verdaguer N. Structural Insights into the Multifunctional Protein VP3 of Birnaviruses. *Structure* 2008;16(1):29-37.
 54. Becht H, Müller H, Müller HK. Comparative Studies on Structural and Antigenic Properties of Two Serotypes of Infectious Bursal Disease Virus. *J Gen Virol* 1988;69(3):631-40.
 55. Fahey KJ, Erny K, Crooks J. A Conformational Immunogen on VP2 of Infectious Bursal Disease Virus that Induces Virus-Neutralizing Antibodies that Passively Protect Chickens. *J Gen Virol* 1989;70:1473-81.
 56. Lombardo E, Maraver A, Castón JR, Rivera J, Fernández-Arias A, Serrano A, et al. 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* 1999;73(8):6973-83.
 57. Tacken MGJ, Peeters BPH, Thomas AAM, Rottier PJM, Boot HJ. Infectious Bursal Disease Virus Capsid Protein VP3 Interacts both with VP1, the RNA-Dependent RNA Polymerase, and with Viral Double-Stranded RNA. *J Virol* 2002;76(22):11301-11.
 58. Irigoyen N, Garriga D, Navarro A, Verdaguer N, Rodríguez JF, Castón JR. Autoproteolytic Activity Derived from the Infectious Bursal Disease Virus Capsid Protein *. *J Biol Chem* 2009;284(12):8064-72.

59. Birghan C, Mundt E, Gorbalenya AE. 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* 2000;19(1):114-23.
60. Jagadish MN, Staton VJ, Hudson PJ, Azad AA. Birnavirus precursor polyprotein is processed in *Escherichia coli* by its own virus-encoded polypeptide. *J Virol* 1988;62(3):1084-7.
61. Sánchez AB, Rodríguez JF. Proteolytic processing in infectious bursal disease virus: identification of the polyprotein cleavage sites by site-directed mutagenesis. *Virology* 1999;262(1):190-9.
62. Lombardo E, Maraver A, Espinosa I, Fernández-Arias A, Rodríguez JF. VP5, the nonstructural polypeptide of infectious bursal disease virus, accumulates within the host plasma membrane and induces cell lysis. *Virology* 2000;277(2):345-57.
63. Liu M, Vakharia VN. Nonstructural Protein of Infectious Bursal Disease Virus Inhibits Apoptosis at the Early Stage of Virus Infection. *J Virol* 2006;80(7):3369-77.
64. Ganguly B, Rastogi SK. Structural and functional modeling of viral protein 5 of Infectious Bursal Disease Virus. *Virus Res* 2018;247:55-60.
65. Snyder DB, Lana DP, Cho BR, Marquardt WW. Group and strain-specific neutralization sites of infectious bursal disease virus defined with monoclonal antibodies. *Avian Dis* 1988;527-34.
66. Jackwood DJ, Sommer SE. Restriction fragment length polymorphisms in the VP2 gene of infectious bursal disease viruses from outside the United States. *Avian Dis* 1999;310-4.
67. Sapats SI, Ignjatovic J. Antigenic and sequence heterogeneity of infectious bursal disease virus strains isolated in Australia. *Arch Virol* 2000;145(4):773-85.
68. Etteradossi N, Picault JP, Drouin P, Guittet M, L'Hospitalier R, Bennejean G. Pathogenicity and Preliminary Antigenic Characterization of Six Infectious Bursal Disease Virus Strains Isolated in France from Acute Outbreaks. *J Vet Med Ser B* 1992;39(1-10):683-91.
69. Van den Berg TP, Gonze M, Meulemans G. Acute infectious bursal disease in poultry: Isolation and characterisation of a highly virulent strain. *Avian Pathol* 1991;20(1):133-43.
70. Cao YC, Yeung WS, Law M, Bi YZ, Leung FC, Lim BL. Molecular Characterization of Seven Chinese Isolates of Infectious Bursal Disease Virus: Classical, Very Virulent, and Variant Strains. *Avian Dis* 1998;42(2):340-51.
71. Chen HY, Zhou Q, Zhang MF, Giambrone JJ. Sequence Analysis of the VP2 Hypervariable Region of Nine Infectious Bursal Disease Virus Isolates from Mainland China. *Avian Dis* 1998;42(4):762-9.
72. Zierenberg K, Raue R, Müller H. Rapid identification of « very virulent » strains of infectious bursal disease virus by reverse transcription-polymerase chain reaction combined with restriction enzyme analysis. *Avian Pathol* 2001;30(1):55-62.
73. Islam MR, Zierenberg K, Müller H. The genome segment B encoding the RNA-dependent RNA polymerase protein VP1 of very virulent infectious bursal disease virus (IBDV) is phylogenetically distinct from that of all other IBDV strains. *Arch Virol* 2001;146(12):2481-92.

74. Banda A, Villegas P, El-Attrache J. Molecular characterization of infectious bursal disease virus from commercial poultry in the United States and Latin America. *Avian Dis* 2003;47(1):87-95.
75. Eterradossi N, Arnould C, Toquin D, Rivallan G. Critical amino acid changes in VP2 variable domain are associated with typical and atypical antigenicity in very virulent infectious bursal disease viruses. *Arch Virol* 1998;143(8):1627-36.
76. Letzel T, Coulibaly F, Rey FA, Delmas B, Jagt E, Van Loon AAMW, et al. Molecular and Structural Bases for the Antigenicity of VP2 of Infectious Bursal Disease Virus. *J Virol* 2007;81(23):12827-35.
77. Box P. High maternal antibody help chicks beat virulent virus. *World Poult* 1989;53:17-9.
78. Rosenberger JK, Cloud SS. Isolation and characterization of variant infectious bursal disease viruses. *J Am Vet Med Assoc* 1986;189:357.
79. Brown MD, Green P, Skinner MA. VP2 sequences of recent European 'very virulent' isolates of infectious bursal disease virus are closely related to each other but are distinct from those of 'classical' strains. *J Gen Virol* 1994;75(3):675-80.
80. Owoade AA, Mulders MN, Kohnen J, Ammerlaan W, Muller CP. High sequence diversity in infectious bursal disease virus serotype 1 in poultry and turkey suggests West-African origin of very virulent strains. *Arch Virol* 2004;149(4):653-72.
81. Di Fabio J, Rossini LI, Eterradossi N, Toquin MD, Gardin Y. European-like pathogenic infectious bursal disease viruses in Brazil. *Vet Rec* 1999;145(7):203-4.
82. Snyder DB. Changes in the field status of infectious bursal disease virus. *Avian Pathol* 1990;19(3):419-23.
83. Proffitt J, Bastin D, Lehrbach P. Sequence analysis of Australian infectious bursal disease viruses. *Aust Vet J* 1999;77(3):186-8.
84. Domingo E, Holland JJ. RNA VIRUS MUTATIONS AND FITNESS FOR SURVIVAL. *Annu Rev Microbiol* 1997;51(1):151-78.
85. Boudaoud A, Mamache B, Tombari W, Ghram A. Les mutations virales et leur impact sur la vaccination contre la bursite infectieuse (maladie de Gumboro). *Rev Sci Tech Int Epiz* 2016;35(3):2.
86. Sun J -H., Lu P, Yan Y -X., Hua X -G., Jiang J, Zhao Y. Sequence and Analysis of Genomic Segment A and B of Very Virulent Infectious Bursal Disease Virus Isolated from China. *J Vet Med Ser B* 2003;50(3):148-54.
87. Kong LL, Omar AR, Hair-Bejo M, Aini I, Seow HF. Sequence analysis of both genome segments of two very virulent Infectious bursal disease virus field isolates with distinct pathogenicity. *Arch Virol* 2004;149(2):425-34.
88. Marquardt WW, Johnson RB, Odenwald WF, Schlotthober BA. An indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for measuring antibodies in chickens infected with infectious bursal disease virus. *Avian Dis* 1980;375-85.

89. Saif YM. Diseases of poultry. 12th ed. Ames (Iowa): Blackwell publ; 2008.
90. Shafqat R, Khan A, Habib M, Shah MSUD, Ali W, Hussain Z, et al. Molecular characterization of infectious bursal disease virus from commercial poultry in Pakistan. *Matrix Sci Medica MSM* 2017;1(2):1-6.
91. Enurah LU, Nwosuh CL, Ehizibolo DO, Sati NM, Emenna PE, Shittu I, et al. Genetic Analysis of Infectious Bursal Disease Virus (IBDV) from a Farm in Vom, Plateau State, Nigeria. *J Adv Microbiol* 2018;12(4):1-6.
92. Ching Wu C, Rubinelli P, Long Lin T. Molecular detection and differentiation of infectious bursal disease virus. *Avian Dis* 2007;51(2):515-26.
93. Sali K. Overview of methods used in the diagnosis of infectious bursal disease. *Vet Med Open J* 2019;4(1):9-17.
94. Jackwood DJ, Saif YM, Moorhead PD. Immunogenicity and Antigenicity of Infectious Bursal Disease Virus Serotypes I and II in Chickens. *Avian Dis* 1985;29(4):1184-94.
95. Ismail NM, Saif YM. Differentiation between Antibodies to Serotypes 1 and 2 Infectious Bursal Disease Viruses in Chicken Sera. *Avian Dis* 1990;34(4):1002-4.
96. Aliy A, Shiferaw S, Shegu D, Senbeta B, Guyassa C, Bulbula A. Diagnostic techniques of infectious bursal disease virus: a review. *Life Sci J* 2020;17(6):1-16.
97. Rodriguez-Chavez IR, Rosenberger JK, Cloud SS. Characterization of the antigenic, immunogenic, and pathogenic variation of infectious bursal disease virus due to propagation in different host systems (bursa, embryo, and cell culture). II. Antigenicity at the epitope level. *Avian Pathol* 2002;31(5):473-83.
98. Wit J de, Heijmans JF, Mekkes DR, Loon A van. Validation of five commercially available ELISAs for the detection of antibodies against infectious bursal disease virus (serotype 1). 2001 [cité 2024 sept 9]; Available from: <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/20013132786>
99. Ashraf S, Abdel-Alim G, Saif YM. Detection of Antibodies Against Serotypes 1 and 2 Infectious Bursal Disease Virus by Commercial ELISA Kits. *Avian Dis* 2006;50(1):104-9.
100. Fahey KJ, McWaters P, Brown MA, Erny K, Murphy VJ, Hewish DR. Virus-Neutralizing and Passively Protective Monoclonal Antibodies to Infectious Bursal Disease Virus of Chickens. *Avian Dis* 1991;35(2):365-73.
101. Snyder DB, Vakharia VN, Savage PK. Naturally occurring-neutralizing monoclonal antibody escape variants define the epidemiology of infectious bursal disease viruses in the United States. *Arch Virol* 1992;127(1-4):89-101.
102. Etteradossi N, Toquin D, Rivallan G, Guittet M. Modified activity of a VP2-located neutralizing epitope on various vaccine, pathogenic and hypervirulent strains of infectious bursal disease virus. *Arch Virol* 1997;142(2):255-70.

103. van den Berg TP, Gonze M, Morales D, Meulemans G. Acute infectious bursal disease in poultry: Immunological and molecular basis of antigenicity of a highly virulent strain. *Avian Pathol* 1996;25(4):751-68.
104. Harris J. Characterization of infectious bursal disease viruses isolated from commercial chickens [Internet]. 2010 [cité 2024 sept 9]; Available from: <http://udspace.udel.edu/handle/19716/5728>
105. Shekaro A, Josiah IE. Infectious bursal disease outbreak in fifteen weeks old pullets in Kaduna, Nigeria. *J Anim Prod Adv* 2015;5(3):636-44.
106. Ramahefarisoa RM. Facteurs influençant la réponse immunitaire humorale suite à la vaccination avec un vaccin vivant contre la maladie de Gumboro chez le poulet de chair. 2011 [cité 2024 sept 9]; Available from: <https://papyrus.bib.umontreal.ca/xmlui/handle/1866/5750>
107. Lin TL, Wu CC, Rosenberger JK, Saif YM. Rapid Differentiation of Infectious Bursal Disease Virus Serotypes by Polymerase Chain Reaction. *J Vet Diagn Invest* 1994;6(1):100-2.
108. Jackwood DJ, Sommer SE. Genetic Heterogeneity in the VP2 Gene of Infectious Bursal Disease Viruses Detected in Commercially Reared Chickens. *Avian Dis* 1998;42(2):321-39.
109. Liu HJ, Giambrone JJ, Dormitorio T. Detection of genetic variations in serotype I isolates of infectious bursal disease virus using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis. *J Virol Methods* 1994;48(2-3):281-91.
110. Jackwood DJ, Spalding BD, Sommer SE. 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* 2003;47(3):738-44.
111. Kabell S, Handberg KJ, Kusk M, Bisgaard M. Detection of infectious bursal disease virus in various lymphoid tissues of experimentally infected specific pathogen free chickens by different reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Avian Dis* 2005;49(4):534-9.
112. Kusk M, Kabell S, Jørgensen PH, Handberg KJ. Differentiation of five strains of infectious bursal disease virus: Development of a strain-specific multiplex PCR. *Vet Microbiol* 2005;109(3-4):159-67.
113. Peters MA, Lin TL, Wu CC. Real-time RT-PCR differentiation and quantitation of infectious bursal disease virus strains using dual-labeled fluorescent probes. *J Virol Methods* 2005;127(1):87-95.
114. Kataria RS, Tiwari AK, Butchaiah G, Kataria JM, Skinner MA. Sequence analysis of the VP2 gene hypervariable region of infectious bursal disease viruses from India. *Avian Pathol* 2001;30(5):501-7.
115. Jackwood DJ, Sommer-Wagner SE. Molecular epidemiology of infectious bursal disease viruses: distribution and genetic analysis of newly emerging viruses in the United States. *Avian Dis* 2005;49(2):220-6.
116. Dormitorio TV, Giambrone JJ, Guo K, Jackwood DJ. Molecular and phenotypic characterization of infectious bursal disease virus isolates. *Avian Dis* 2007;51(2):597-600.

117. Icard AH, Sellers HS, Mundt E. Detection of Infectious Bursal Disease Virus Isolates with Unknown Antigenic Properties by Reverse Genetics. *Avian Dis* 2008;52(4):590-8.
118. Ndashe K, Simulundu E, Hang'ombe BM, Moonga L, Ogawa H, Takada A, et al. Molecular characterization of infectious bursal disease viruses detected in vaccinated commercial broiler flocks in Lusaka, Zambia. *Arch Virol* 2016;161(3):513-9.
119. Drissi Touzani C, Fellahi S, Gaboun F, Fassi Fihri O, Baschieri S, Mentag R, et al. Molecular characterization and phylogenetic analysis of very virulent infectious bursal disease virus circulating in Morocco during 2016-2017. *Arch Virol* 2019;164(2):381-90.
120. Yilmaz A, Turan N, Bayraktar E, Gurel A, Cizmecigil UY, Aydin O, et al. Phylogeny and evolution of infectious bursal disease virus circulating in Turkish broiler flocks. *Poult Sci* 2019;98(5):1976-84.
121. Yu L, Li JR, Huang YW, Dikki J, Deng R. Molecular characteristics of full-length genomic segment A of three infectious bursal disease viruses in China: two attenuated strains and one virulent field strain. *Avian Dis* 2001;862-74.
122. Heine HG, Haritou M, Failla P, Fahey K, Azad A. Sequence Analysis and Expression of the Host-protective Immunogen VP2 of a Variant Strain of Infectious Bursal Disease Virus Which Can Circumvent Vaccination with Standard Type I Strains. *J Gen Virol* 1991;72(8):1835-43.
123. Hernández M, Banda A, Hernández D, Panzera F, Pérez R. Detection of very virulent strains of infectious bursal disease virus (vvIBDV) in commercial broilers from Uruguay. *Avian Dis* 2006;50(4):624-31.
124. Felice V, Franzo G, Catelli E, Di Francesco A, Bonci M, Cecchinato M, et al. Genome sequence analysis of a distinctive Italian infectious bursal disease virus. *Poult Sci* 2017;96(12):4370-7.
125. Alkhalefa N, El-Abasy M, Kasem S, Abu El-Naga E. Molecular characterisation of infectious bursal disease virus (IBDV) isolated from commercial broiler chickens in Nile Delta. *Bulg J Vet Med* 2019;22(4):399-408.
126. Mundt E. Tissue culture infectivity of different strains of infectious bursal disease virus is determined by distinct amino acids in VP2. *J Gen Virol* 1999;80(8):2067-76.
127. Kwon HM, Kim SJ. Sequence Analysis of the Variable VP2 Gene of Infectious Bursal Disease Viruses Passaged in Vero Cells. *Virus Genes* 2004;28(3):285-91.
128. Lasher HN, Davis VS. History of infectious bursal disease in the USA: The first two decades. *Avian Dis* 1997;11-9.
129. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals: Mammals, Birds, and Bees. Office international des épizooties; 2008.
130. Lukert PD, Saif YM. Infectious bursal disease. 721-738. *Dis Poult* 10th Ed Iowa State Univ Press Ames Iowa USA 1997;
131. Hair-Bejo M, Ng MK, Ng HY. Day old vaccination against infectious bursal disease in broiler chickens. *Int J Poult Sci* 2004;3(2):124-8.

132. Wang YS, Wang ZC, Tang YD, Shi ZL, He KW, Li Y, et al. Comparison of four infectious bursal disease viruses isolated from different bird species. *Arch Virol* 2007;152(10):1787-97.
133. Escaffre O, Le Nouën C, Amelot M, Ambroggio X, Ogden KM, Guionie O, et al. Both Genome Segments Contribute to the Pathogenicity of Very Virulent Infectious Bursal Disease Virus. *J Virol* 2013;87(5):2767-80.
134. OGAWA M, WAKUDA T, YAMAGUCHI T, MURATA K, SETIYONO A, FUKUSHI H, et al. Seroprevalence of infectious bursal disease virus in free-living wild birds in Japan. *J Vet Med Sci* 1998;60(11):1277-9.
135. Aliyu HB, Sa'idu L, Jamilu A, Andamin AD, Akpavie SO. Outbreaks of Virulent Infectious Bursal Disease in Flocks of Battery Cage Brooding System of Commercial Chickens. *J Vet Med* 2016;2016:1-7.
136. Bumstead N, Reece RL, COOK JK. Genetic differences in susceptibility of chicken lines to infection with infectious bursal disease virus. *Poult Sci* 1993;72(3):403-10.
137. Nielsen OL, Sørensen P, Hedemand JE, Laursen SB, Jørgensen PH. Inflammatory response of different chicken lines and B haplotypes to infection with infectious bursal disease virus. *Avian Pathol* 1998;27(2):181-9.
138. Meroz M. An epidemiological survey of Gumboro disease. 1966 [cité 2024 sept 9]; Available from: <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/19672205296>
139. Tippenhauer M, Heller DE, Weigend S, Rautenschlein S. The host genotype influences infectious bursal disease virus pathogenesis in chickens by modulation of T cells responses and cytokine gene expression. *Dev Comp Immunol* 2013;40(1):1-10.
140. Benton WJ, Cover MS, Rosenberger JK, Lake RS. Physicochemical properties of the infectious bursal agent (IBA). *Avian Dis* 1967;11(3):438-45.
141. Landgraf H, Vielitz E, Kirsch R. Occurrence of an infectious disease affecting the bursa of Fabricius (Gumboro disease). 1967 [cité 2024 sept 10]; Available from: <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/19672202286>
142. Teshome M, Fentahunand T, Admassu B. Infectious bursal disease (Gumboro disease) in Chickens. *Br J Poult Sci* 2015;4(1):22-8.
143. Lawal N, Hair-Bejo M, Arshad SS, Omar AR, Ideris A. Adaptation and Molecular Characterization of Two Malaysian Very Virulent Infectious Bursal Disease Virus Isolates Adapted in BGM-70 Cell Line. *Adv Virol* 2017;2017:1-19.
144. Kegne T, Chanie M. Review on the incidence and pathology of infectious bursal disease. *Br J Poult Sci* 2014;3:68-77.
145. Benton WJ, Cover MS, Rosenberger JK. Studies on the transmission of the infectious bursal agent (IBA) of chickens. *Avian Dis* 1967;11(3):430-8.
146. Wagari A. A review on infectious bursal disease in poultry. *Health Econ Outcome Res Open Access* 2021;7(2):167.

147. Ojkic D, Martin E, Swinton J, Binnington B, Brash M. Genotyping of Canadian field strains of infectious bursal disease virus. *Avian Pathol* 2007;36(5):427-33.
148. Chettle NJ, Stuart JC, Wyeth PJ. Outbreak of virulent infectious bursal disease in East Anglia. 1989 [cité 2024 sept 9];Available from: <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/19892297520>
149. Rashid MH, Xue C, Islam MT, Islam MR, Cao Y. Risk factors associated with infectious bursal disease in commercial chickens in Bangladesh. *Prev Vet Med* 2013;111(1-2):181-5.
150. McFerran JB. Infectious bursal disease. 1993 [cité 2024 sept 10];Available from: <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/19952221014>
151. Ingraio F, Rauw F, Lambrecht B, van den Berg T. Infectious Bursal Disease: A complex host-pathogen interaction. *Dev Comp Immunol* 2013;41(3):429-38.
152. HIRAGA M, NUNOYA T, OTAKI Y, TAJIMA M, SAITO T, NAKAMURA T. Pathogenesis of highly virulent infectious bursal disease virus infection in intact and bursectomized chickens. *J Vet Med Sci* 1994;56(6):1057-63.
153. Nunoya T, Otaki Y, Tajima M, Hiraga M, Saito T. Occurrence of acute infectious bursal disease with high mortality in Japan and pathogenicity of field isolates in specific-pathogen-free chickens. *Avian Dis* 1992;597-609.
154. Hirai K, Funakoshi T, Nakai T, Shimakura S. Sequential changes in the number of surface immunoglobulin-bearing B lymphocytes in infectious bursal disease virus-infected chickens. *Avian Dis* 1981;484-96.
155. Rodenberg J, Sharma JM, Belzer SW, Nordgren RM, Naqi S. Flow cytometric analysis of B cell and T cell subpopulations in specific-pathogen-free chickens infected with infectious bursal disease virus. *Avian Dis* 1994;16-21.
156. Vasconcelos AC, Lam KM. Apoptosis induced by infectious bursal disease virus. *J Gen Virol* 1994;75(7):1803-6.
157. Eldaghayes I, Rothwell L, Williams A, Withers D, Balu S, Davison F, et al. Infectious Bursal Disease Virus: Strains That Differ in Virulence Differentially Modulate the Innate Immune Response to Infection in the Chicken Bursa. *Viral Immunol* 2006;19(1):83-91.
158. Liu H, Zhang M, Han H, Yuan J, Li Z. Comparison of the expression of cytokine genes in the bursal tissues of the chickens following challenge with infectious bursal disease viruses of varying virulence. *Virology* 2010;7(1):364.
159. Fernández-Arias A, Martínez S, Rodríguez JF. The major antigenic protein of infectious bursal disease virus, VP2, is an apoptotic inducer. *J Virol* 1997;71(10):8014-8.
160. Li Z, Wang Y, Xue Y, Li X, Cao H, Zheng SJ. Critical Role for Voltage-Dependent Anion Channel 2 in Infectious Bursal Disease Virus-Induced Apoptosis in Host Cells via Interaction with VP5. *J Virol* 2012;86(3):1328-38.
161. INOUE M, YAMAMOTO H, MATUO K, HIHARA H. Susceptibility of chicken monocytic cell lines to infectious bursal disease virus. *J Vet Med Sci* 1992;54(3):575-7.

162. Kim IJ, Karaca K, Pertile TL, Erickson SA, Sharma JM. Enhanced expression of cytokine genes in spleen macrophages during acute infection with infectious bursal disease virus in chickens. *Vet Immunol Immunopathol* 1998;61(2-4):331-41.
163. Khatri M, Palmquist JM, Cha RM, Sharma JM. Infection and activation of bursal macrophages by virulent infectious bursal disease virus. *Virus Res* 2005;113(1):44-50.
164. Sharma JM, Kim IJ, Rautenschlein S, Yeh HY. Infectious bursal disease virus of chickens: pathogenesis and immunosuppression. *Dev Comp Immunol* 2000;24(2-3):223-35.
165. Tanimura N. Pathological Changes and Pathogenic Mechanisms of Infectious Bursal Disease (IBD) in Chickens Infected with IBD Viruses of Different Pathogenicities. *Jpn Agric Res Q JARQ* 2022;56(1):33-40.
166. Skeeles JK, Lukert PD, De Buysscher EV, Fletcher OJ, Brown J. Infectious bursal disease viral infections. I. Complement and virus-neutralizing antibody response following infection of susceptible chickens. *Avian Dis* 1979;95-106.
167. Ivanyi J, Morris R. Immunodeficiency in the chicken. IV. An immunological study of infectious bursal disease. *Clin Exp Immunol* 1976;23(1):154.
168. Kusters J, Becht H, Rudolph R. Properties of the infectious bursal agent of chicken (IBA). 1972 [cité 2024 sept 10]; Available from: <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/19722203027>
169. Skeeles JK, Slavik M, Beasley JN, Brown AH, Meinecke CF, Maruca S, et al. An age-related coagulation disorder associated with experimental infection with infectious bursal disease virus. *Am J Vet Res* 1980;41(9):1458-61.
170. Allan WH, Faragher JT, Cullen GA. Immunosuppression by the infectious bursal agent in chickens immunised against Newcastle disease. 1972 [cité 2024 oct 6]; Available from: <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/19722200451>
171. Confer AW, Springer WT, Shane SM, Donovan JF. Sequential mitogen stimulation of peripheral blood lymphocytes from chickens inoculated with infectious bursal disease virus. *Am J Vet Res* 1981;42(12):2109-13.
172. Kim IJ, Gagic M, Sharma JM. Recovery of antibody-producing ability and lymphocyte repopulation of bursal follicles in chickens exposed to infectious bursal disease virus. *Avian Dis* 1999;40:1-13.
173. Snyder DB, Marquardt WW, Mallinson ET, Russek-Cohen E, Savage PK, Allen DC. Rapid serological profiling by enzyme-linked immunosorbent assay. IV. Association of infectious bursal disease serology with broiler flock performance. *Avian Dis* 1986;139-48.
174. Inoue M, Fukuda M, Miyano K. Thymic lesions in chicken infected with infectious bursal disease virus. *Avian Dis* 1994;839-46.
175. Kim IJ, Sharma JM. IBDV-induced bursal T lymphocytes inhibit mitogenic response of normal splenocytes. *Vet Immunol Immunopathol* 2000;74(1-2):47-57.

176. Lee CC, Kim BS, Wu CC, Lin TL. Bursal transcriptome of chickens protected by DNA vaccination versus those challenged with infectious bursal disease virus. *Arch Virol* 2015;160(1):69-80.
177. Wang Y, Qi X, Gao H, Gao Y, Lin H, Song X, et al. 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* 2009;157(2):205-10.
178. Davison F, Kaspers B, Schat KA, Davison TF, éditeurs. *Avian immunology*. Amsterdam London: Academic; 2008.
179. Iván J, Velhner M, Ursu K, Germán P, Mató T, Drén CN, et al. Delayed vaccine virus replication in chickens vaccinated subcutaneously with an immune complex infectious bursal disease vaccine: quantification of vaccine virus by real-time polymerase chain reaction. *Can J Vet Res* 2005;69(2):135.
180. Elankumaran S, Heckert RA, Moura L. Pathogenesis and tissue distribution of a variant strain of infectious bursal disease virus in commercial broiler chickens. *Avian Dis* 2002;46(1):169-76.
181. Orakpoghenor O, Oladele SB, Abdu PA. Research Note: detection of infectious bursal disease virus antibodies in free-living wild birds in Zaria, Nigeria. *Poult Sci* 2020;99(4):1975-7.
182. Van den Berg TP, Eterradossi N, Toquin D, Meulemans G. Infectious bursal disease (Gumboro disease). *Rev Sci Tech Int Off Epizoot* 2000;19(2):509-43.
183. Kurukulsuriya S, Ahmed KA, Ojkic D, Gunawardana T, Gupta A, Goonewardene K, et al. Circulating strains of variant infectious bursal disease virus may pose a challenge for antibiotic-free chicken farming in Canada. *Res Vet Sci* 2016;108:54-9.
184. Zachar T, Popowich S, Goodhope B, Knezacek T, Ojkic D, Willson P, et al. A 5-year study of the incidence and economic impact of variant infectious bursal disease viruses on broiler production in Saskatchewan, Canada. *Can J Vet Res* 2016;80(4):255-61.
185. Ignjatovic J. Very virulent infectious bursal disease virus. *Aust N Z Stand Diagn Proced [Internet]* 2004 [cité 2024 sept 9];6. Available from: <https://www.agriculture.gov.au/sites/default/files/sitecollectiondocuments/animal/ahl/ANZS DP-Very-virulent-infectious-bursal-disease-virus-VVIBV.pdf>
186. Tanimura N, Tsukamoto K, Nakamura K, Narita M, Maeda M. Association between pathogenicity of infectious bursal disease virus and viral antigen distribution detected by immunohistochemistry. *Avian Dis* 1995;9-20.
187. Adino GW, Bayu MD. Review of diagnostic and vaccination approaches of infectious bursal disease of poultry. *Vet Med Open J* 2022;7:22-8.
188. Dey S, Pathak DC, Ramamurthy N, Maity HK, Chellappa MM. Infectious bursal disease virus in chickens: prevalence, impact, and management strategies. *Vet Med Res Rep* 2019;10:85-97.
189. Winterfield RW, Hitchner SB. Etiology of an infectious nephritis-nephrosis syndrome of chickens. 1962 [cité 2024 sept 10]; Available from: <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/19632201578>

190. RUMA – Responsible Use of Medicines in Agriculture Alliance [Internet]. [cité 2024 sept 9]; Available from: <https://www.ruma.org.uk/>
191. Marangon S, Busani L. The use of vaccination in poultry production. *Rev Sci Tech-Off Int Epizoot* 2007;26(1):265.
192. Bentaleb R. La maladie de Gumboro : Etat des lieux et perspectives. TAM-TAM Maghreb CEVA Santé Anim. 2006;6.
193. Sellam K. Vaccination contre la maladie de Gumboro: Essai clinique terrain du bursamune® in ovo. 2001;
194. Sylvain G, Marianne C, Marie-Laure J, Claude R, François-Xavier LG. EFFICACITE D'UN VACCIN RECOMBINE HVT-VP2 CONTRE LA MALADIE DE GUMBORO, EN PRESENCE D'ANTICORPS PARENTAUX.
195. Ferré JY, Belloc CC. Détermination de la date de vaccination contre la maladie de Gumboro en élevage de poulets label [Internet]. In: 6. Journées de la Recherche Avicole. ITAVI-Institut Technique de l'Aviculture; 2005 [cité 2024 oct 7]. Available from: <https://hal.science/hal-02761570/>
196. Kouwenhoven B, Bos J van den. Control of very virulent infectious bursal disease (Gumboro disease) in the Netherlands with so called" hot" vaccines. 1992 [cité 2024 sept 9]; Available from: <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/19942206198>
197. Lasher HN, Shane S. Infectious bursal disease. *Worlds Poult Sci J* 1994;50(2):133-66.
198. Nagarajan MM, Kibenge FS. Infectious bursal disease virus: a review of molecular basis for variations in antigenicity and virulence. *Can J Vet Res* 1997;61(2):81.
199. Lucio B, Hitchner SB. Infectious bursal disease emulsified vaccine: effect upon neutralizing-antibody levels in the dam and subsequent protection of the progeny. *Avian Dis* 1979;466-78.
200. Naqi SA, Marquez B, Sahin N. Maternal antibody and its effect on infectious bursal disease immunization. *Avian Dis* 1983;623-31.
201. Al-Natour MQ, Ward LA, Saif YM, Stewart-Brown B, Keck LD. Effect of Different Levels of Maternally Derived Antibodies on Protection Against Infectious Bursal Disease Virus. *Avian Dis* 2004;48(1):177-82.
202. Maas RA, Venema S, Oei HL, Pol JMA, Claassen IJTM, Ter Huurne AAHM. Efficacy of inactivated infectious bursal disease (IBD) vaccines: Comparison of serology with protection of progeny chickens against IBD virus strains of varying virulence. *Avian Pathol* 2001;30(4):345-54.
203. Van Den Berg TP, Meulemans G. Acute infectious bursal disease in poultry: Protection afforded by maternally derived antibodies and interference with live vaccination. *Avian Pathol* 1991;20(3):409-21.
204. De Wit JJ. Gumboro disease: estimation of optimal time of vaccination by the Deventer formula. *Annu Rep Proc COST Action* 2001;839:170-8.

205. Rautenschlein S, Yeh HY, Sharma JM. Comparative immunopathogenesis of mild, intermediate, and virulent strains of classic infectious bursal disease virus. *Avian Dis* 2003;47(1):66-78.
206. Whitfill CE, Haddad EE, Ricks CA, Skeeles JK, Newberry LA, Beasley JN, et al. Determination of optimum formulation of a novel infectious bursal disease virus (IBDV) vaccine constructed by mixing bursal disease antibody with IBDV. *Avian Dis* 1995;687-99.
207. Giambrone JJ, Dormitorio T, Brown T. Safety and efficacy of in ovo administration of infectious bursal disease viral vaccines. *Avian Dis* 2001;144-8.
208. Haddad EE, Whitfill CE, Avakian AP, Ricks CA, Andrews PD, Thoma JA, et al. Efficacy of a novel infectious bursal disease virus immune complex vaccine in broiler chickens. *Avian Dis* 1997;882-9.
209. Le Gros FX, Dancer A, Giacomini C, Pizzoni L, Bublot M, Graziani M, et al. Field efficacy trial of a novel HVT-IBD vector vaccine for 1-day-old broilers. *Vaccine* 2009;27(4):592-6.
210. Bublot M, Pritchard N, Le Gros FX, Goutebroze S. Use of a vectored vaccine against infectious bursal disease of chickens in the face of high-titred maternally derived antibody. *J Comp Pathol* 2007;137:S81-4.
211. Zorman Rojs O, Krapež U, Slavec B, Juršič-Cizerl R, Poljanec T. Field efficacy of different vaccines against infectious bursal disease in broiler flocks. *Acta Vet Hung* 2011;59(3):385-98.
212. Perozo F, Villegas P, Fernandez R, Cruz J, Pritchard N. Efficacy of single dose recombinant herpesvirus of turkey infectious bursal disease virus (IBDV) vaccination against a variant IBDV strain. *Avian Dis* 2009;53(4):624-8.
213. Becheur M, Lounas A, Messaoudi O, Oumouna-Benachour K, Oumouna M. MOLECULAR CHARACTERIZATION OF INFECTIOUS BURSAL DISEASE VIRUS ISOLATED FROM BROILER AND PULLET FLOCKS IN ALGERIA. *J Anim PLANT Sci-JAPS* 2024;34(1):73-89.
214. Luna LG. *Manual of histologic staining methods of the armed forces institute of pathology.* McGraw-Hill Book Co 1968;
215. Moscoso H, Alvarado I, Hofacre CL. Molecular analysis of infectious bursal disease virus from bursal tissues collected on FTA[®] filter paper. *Avian Dis* 2006;50(3):391-6.
216. Amin OGM, Jackwood DJ. Identification and molecular analysis of infectious bursal disease in broiler farms in the Kurdistan Regional Government of Iraq. *Trop Anim Health Prod* 2014;46(7):1297-301.
217. Brown MD, Skinner MA. Coding sequences of both genome segments of a European 'very virulent' infectious bursal disease virus. *Virus Res* 1996;40(1):1-15.
218. Yamaguchi T, Ogawa M, Inoshima Y, Miyoshi M, Fukushi H, Hirai K. Identification of sequence changes responsible for the attenuation of highly virulent infectious bursal disease virus. *Virology* 1996;223(1):219-23.

219. Brandt M, Yao K, Liu M, Heckert RA, Vakharia VN. Molecular Determinants of Virulence, Cell Tropism, and Pathogenic Phenotype of Infectious Bursal Disease Virus. *J Virol* 2001;75(24):11974-82.
220. Michel LO, Jackwood DJ. Classification of infectious bursal disease virus into genogroups. *Arch Virol* 2017;162(12):3661-70.
221. Thai TN, Jang I, Kim HA, Kim HS, Kwon YK, Kim HR. Characterization of antigenic variant infectious bursal disease virus strains identified in South Korea. *Avian Pathol* 2021;50(2):174-81.
222. Mwenda R, Changula K, Hang'ombe BM, Chidumayo N, Mangani AS, Kaira T, et al. Characterization of field infectious bursal disease viruses in Zambia: evidence of co-circulation of multiple genotypes with predominance of very virulent strains. *Avian Pathol* 2018;47(3):300-13.
223. Shekhar S, Dalai N. A Review on Infectious Bursal Disease-Major Concern in Poultry. *Int J Curr Microbiol App Sci* 2020;9(6):535-41.
224. Silva MS e, Rissi DR, Swayne DE. Very virulent infectious bursal disease virus produces more-severe disease and lesions in specific-pathogen-free (SPF) leghorns than in SPF broiler chickens. *Avian Dis* 2016;60(1):63-6.
225. Tolba HMN, Awad NFS, Kotb GKF, Adel A. Molecular diagnosis of persistently very virulent infectious bursal disease virus at Sharkia Governorate, Egypt. *Hosts Viruses* 2019;6(3):42.
226. Khenenou T, Bougherara M, Melizi M, Lamraoui R. Histomorphological study of the bursae of fabricius of broiler chickens during Gumboro disease in algeria area. *Glob Vet* 2017;18(2):132-6.
227. Umami H, Maqbool A, Safdar M, Zia N, Mehmood A, Usman M, et al. Detection and phylogeny of infectious bursal disease virus (IBDV) during field outbreaks in broilers. *Pak J Zool* 2020;52(2):659.
228. Wani BM, Darzi MM, Kamil SA, Shah S, Adil S, Ayaşan T. Gross, histopathological, histoenzymatic and histochemical studies on infectious bursal disease in broiler chickens. *JAPS J Anim Plant Sci [Internet]* 2021 [cité 2024 sept 9];31(1). Available from: <http://www.thejaps.org.pk/docs/v-31-01/04.pdf>
229. Bejo H, Tee LW, Chulan U. Response of gut associated lymphoid tissue of chickens (GALT) to very virulent IBD virus of Malaysian isolate. *J Anim Vet Adv* 2004;3(3):142-7.
230. Omer MG, Khalafalla AI. Epidemiology and laboratory diagnosis of very virulent infectious bursal disease virus in vaccinated chickens in Khartoum, Sudan. *Open Vet J* 2022;12(1):33-43.
231. Rodríguez-Lecompte JC, Niño-Fong R, Lopez A, Markham RF, Kibenge FS. Infectious bursal disease virus (IBDV) induces apoptosis in chicken B cells. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2005;28(4):321-37.
232. Jungmann A, Nieper H, Müller H. Apoptosis is induced by infectious bursal disease virus replication in productively infected cells as well as in antigen-negative cells in their vicinity. *J Gen Virol* 2001;82(5):1107-15.

233. Boya P, Roques B, Kroemer G. Viral and bacterial proteins regulating apoptosis at the mitochondrial level. *EMBO J* 2001;20(16):4325-31.
234. Hay S, Kannourakis G. A time to kill: viral manipulation of the cell death program. *J Gen Virol* 2002;83(7):1547-64.
235. Jackwood DJ, Sommer-Wagner S. Genetic characteristics of infectious bursal disease viruses from four continents. *Virology* 2007;365(2):369-75.
236. Adamu J, Owoade AA, Abdu PA, Kazeem HM, Fatihu MY. Characterization of field and vaccine infectious bursal disease viruses from Nigeria revealing possible virulence and regional markers in the VP2 minor hydrophilic peaks. *Avian Pathol* 2013;42(5):420-33.
237. Awandkar SP, Tembhurne PA, Kesharkar JA, Kurkure NV, Chaudhari SP, Bonde SW, et al. Identification and characterization of a novel infectious bursal disease virus from outbreaks in Maharashtra Province of India. *Vet World* 2018;11(10):1516-25.
238. Lachheb J, Jbenyeni A, Nsiri J, Larbi I, Ammouna F, Ghram A. Full-length genome sequencing of a very virulent infectious bursal disease virus isolated in Tunisia. *Poult Sci* 2021;100(2):496-506.
239. Xu A, Pei Y, Zhang K, Xue J, Ruan S, Zhang G. Phylogenetic analyses and pathogenicity of a variant infectious bursal disease virus strain isolated in China. *Virus Res* 2020;276:197833.
240. Pikuła A, Lisowska A, Jasik A, Śmietanka K. Identification and assessment of virulence of a natural reassortant of infectious bursal disease virus. *Vet Res* 2018;49(1):89.
241. Drissi Touzani C, Fellahi S, Fassi Fihri O, Gaboun F, Khayi S, Mentag R, et al. Complete genome analysis and time scale evolution of very virulent infectious bursal disease viruses isolated from recent outbreaks in Morocco. *Infect Genet Evol* 2020;77:104097.