

CARTOGRAPHIE DE LA DETECTION D'UN VIRUS REASSORTANT DE LA BURSITE INFECTIEUSE EN POULET DE CHAIR EN FRANCE.

Moreau Elisabeth¹, Mouchel Simon¹, Castagnos Stéphanie¹

¹Ceva Santé Animale - 10 avenue de la Ballastière - 33500 Libourne
elisabeth.moreau@ceva.com

RÉSUMÉ

Le virus de la maladie de Gumboro ou bursite infectieuse, distribué mondialement, provoque une maladie immunosuppressive chez les jeunes poulets et poulettes. Des souches réassortantes de virus de la bursite infectieuse (IBDV / maladie de Gumboro) ont été détectées en Europe depuis 2017. Mato et al. ont décrit un nouveau type de virus réassortant en 2020. Il est caractérisé par une VP2 vvIBDV (very virulent IBDV, genogroupe 3) et une VP1 classique. Les infections provoquées par ces réassortants ont été décrites par Mato comme subcliniques sur le terrain (en l'absence d'agent compliquant) et testées en conditions standardisées sur des oiseaux SPF (ni mortalité ni signes cliniques n'ont été observés). La pathogénicité de ces souches en conditions terrain n'est pas encore parfaitement connue. Cette étude a été conduite en France entre le premier et le troisième trimestre 2021.

Dans un premier temps, ont été recrutés des lots de poulets qui présentaient des résultats technico-économiques dégradés, puis nous avons élargi l'étude à des lots pris au hasard, afin d'évaluer la prévalence de ces réassortants sur un périmètre plus large.

Les souches détectées en France dans le cadre de cette étude présentent un fort taux d'homologie de la VP2 avec la souche réassortante MN786768 (souche Mato). Ces virus ont été détectés par PCR et séquençage.

Cette enquête a permis de détecter la présence de ces nouveaux virus réassortants dans plusieurs régions du territoire français. La cartographie de ces isolats est présentée ici.

Ces souches circulent peut-être depuis longtemps sur le territoire français mais les méthodes d'analyses utilisées sur le terrain ne permettaient pas toujours de les identifier. En effet, elles ne sont pas détectables par toutes les méthodes PCR classiquement utilisées dans les laboratoires d'analyses. Nous supposons que la prévalence de ces virus réassortants est plus importante que celle présentée dans cette publication.

La présence de ce type de virus doit être prise en considération par l'accompagnement vétérinaire et technique des élevages en vue d'adapter les protocoles de biosécurité et de prophylaxie vaccinale.

ABSTRACT

Reassortant of infectious bursal disease virus on broilers in France.

Gumboro disease virus or infectious bursal disease virus, worldwide distributed, causes immunosuppressive illness in chickens.

Reassortant strains of infectious bursal disease (IBDV / Gumboro disease) were detected in Europe since 2017. Mato et al., described these new reassortant strains in 2020. Their characteristics are a VP2 vvIBDV (very virulent IBDV, genogroup 3), and a classic VP1. Infections caused by these reassortants were described by Mato as subclinical in the field (in the absence of complicating agent) and tested in standardized pathogenicity test in SPF layer chicken (no mortality or clinical signs occurred). Pathogenicity of these strains in field conditions are not already well known. This study was conducted in France between first and third trimester 2021.

First, broiler flocks were recruited with degraded technicoeconomical results, then, the study was extended to flocks taken at random in order to assess reassortant strains prevalence over a wider area.

Detected strains in France during this study have a huge VP2 homology with reassortant strain MN786768 (Mato strain). These viruses were detected by PCR and sequencing. Our investigation made it possible to detect the presence of these new reassortant viruses emerging in several regions of French territory.

We present here the cartography of these isolates.

These strains have perhaps been circulating for a long time on French territory, but the methods of analysis used in the field did not always allow them to be identified. Indeed, they are not detectable by all the PCR methods conventionally used in laboratories. The prevalence of these reassortant viruses is probably greater than that presented in this publication.

The presence of this virus type must be taken into account by veterinarians and technical support in order to adapt the biosecurity and vaccine prophylaxis protocol.

1. INTRODUCTION

La bursite infectieuse, aussi appelée maladie de Gumboro est causée par un virus membre du genre Avibirnavirus (famille des Birnaviridae). La maladie de Gumboro est une maladie très contagieuse provoquant une immunosuppression quand l'infection surgit précocement chez le poulet ou la poulette future pondeuse. Le virus de la bursite infectieuse est un virus non-enveloppé. Cette particularité morphologique le rend très résistant dans l'environnement des élevages avicoles. Il a un génome constitué de deux segments d'ARN double brin, nommés les segments A et B respectivement. (Muller et al., 1979). Le segment A contient deux ORF (open reading frames). Le plus long code pour la polyprotéine VP2-VP4-VP3 qui se clive ensuite en VP2 (viral protein 2), la protéine de capsid qui forme la surface externe du virion. C'est la protéine la plus immunogène, qui est responsable de la production d'anticorps neutralisants. La polyprotéine se clive également en VP4, la protéase virale responsable du clivage de la polyprotéine et en VP3, la ribonucléoprotéine. Le plus petit ORF code pour la VP5, un facteur pro-apoptotique dont on pense qu'il facilite la libération du virus. Le segment B code pour la VP1, la polymérase virale (Eterradossi et Saif, 2013).

Deux sérotypes d'IBDV (virus de la bursite infectieuse) ont été décrits. Les virus du sérotype 1 peuvent être catégorisés comme subcliniques (naturels ou atténués), variants, classiques, et hypervirulents (very virulent IBDV, vvIBDV) (Jackwood, et al, 2018). Les virus de sérotype 2 ne sont pas pathogènes. Les souches virulentes provoquent une sévère nécrose lymphoïde et une inflammation de la bourse de Fabricius des poulets infectés, résultant en des niveaux variables de mortalité et d'immunodéficience qui dépendent de la virulence de la souche, de la lignée génétique des volailles (ponte ou chair), du niveau d'anticorps d'origine maternelle et de l'âge des animaux au moment de l'infection. Les souches hypervirulentes (vvIBDV) ont été pour la première fois isolées en Europe sur des poulets à la fin des années 80 (Chettle, 1989). Elles peuvent provoquer une forte morbidité et jusqu'à plus de 30% de mortalité (Saif, 2013). Les souches de variant antigénique qui sont devenues prédominantes sur le continent américain, provoquent habituellement des infections subcliniques.

Les birnavirus peuvent évoluer, par mutation ou par réassortiment du génome, et beaucoup plus rarement par recombinaison.

Des souches réassortantes de virus de la bursite infectieuse ont été détectées en Europe depuis 2017. Mato et al. ont décrit un nouveau type de virus réassortant en 2020. Il est caractérisé par une VP2 vvIBDV (génogroupe 3) et une VP1 classique (génogroupe 1). Les infections provoquées par ces réassortants ont été décrites comme subcliniques sur le terrain (en l'absence d'agent compliquant) et testées en conditions standardisées sur des oiseaux exempts d'organismes pathogènes spécifiques (EOPS). Ni mortalité, ni signes cliniques n'ont été observés, mais une atrophie marquée de la bourse de Fabricius (données internes Ceva Santé Animale). La pathogénicité de ces souches sur le terrain n'est pas encore bien connue.

Cette étude porte sur l'identification de souches de ce type sur le territoire français en 2021.

2. MATERIELS ET METHODES

2.1. Sélection des lots de poulets.

Les lots de poulets inclus dans notre étude ont été sélectionnés soit de façon aléatoire dans le cadre de suivis épidémiologiques réalisés en routine dans des élevages français par le laboratoire Ceva Santé Animale, soit de manière ciblée dans le cadre de suspicions cliniques manifestées par des baisses de performances techniques.

2.2. Echantillonnage

Le matériel biologique de choix utilisé pour la recherche de virus IBDV est la bourse de Fabricius. Le prélèvement de la bourse de 4 à 10 poulets de chair par lot d'élevage a été pratiqué à l'âge moyen de 35 jours, suite à l'autopsie de sujets représentatifs des lots étudiés.

2.3. Techniques d'analyse

Extraction de l'ARN, RT-PCR et séquençage. Après élution de la carte FTA, avec prélèvements poolés par carte dans du PBS, l'extraction de l'ARN a été réalisée en utilisant le kit High Pure Viral Nucleic Acid (Roche™, Basel, Switzerland) selon les instructions du fabricant. Les échantillons d'ARN ont ensuite été analysés avec une méthode RT-PCR en une étape visant la région hypervariable de la VP2. La paire d'amorces utilisée était 743-1 (5'-GCCAGAGTCTACACCAT-3') et 743-2 (5'-CCCGATTATGTCTTTGA-3'), conçue par Jackwood & SommerWagner en 2005. Ces amorces ont été également utilisées pour séquencer les échantillons positifs par Sanger. Après l'évaluation de la qualité avec FinchTV (<http://www.geospiza.com/Products/finchtv.shtml>), les chromatogrammes obtenus ont été assemblés en séquences

consensuelles avec ChromasPro (Technelysium Pty Ltd, Helensvale, QLD, Australia). Si une souche terrain était détectée, une autre analyse, basée sur une paire d'amorces B-Univ-F (5'-AATGAGGAGTATGAGACCGA-3') et B-Univ-R (5'-CCTTCTCTAGGTCAATTGAGTACC-3') conçue par Islam et al. (2012), a été utilisée pour amplifier et séquencer une portion de la VP1. Toutes les PCRs ont été réalisées en utilisant le SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum™ Taq DNA Polymerase kit (Invitrogen™, Waltham, MA, USA).

2.4. Classification des souches

La méthode MUSCLE (Edgar, 2004) a été utilisée dans Mega X (Kumar et al., 2018), les séquences de la VP1 et de la VP2 ont été alignées sur deux jeux séparés de données incluant les souches de référence décrites par Islam et al. (2021), et comprenant les souches réassortantes détectées en Europe du Nord par Mato et al. (2020). Deux arbres phylogénétiques ont par la suite été déduits en utilisant la méthode Neighbor Joining sur Mega X (Kumar et al., 2018) et utilisés pour classer les souches.

2.5. Légende des arbres phylogénétiques

La relation phylogénétique des souches détectées dans l'enquête épidémiologique (marquées par un rond noir) avec les séquences de référence de VP2 (a) et VP1(b) a été indiquée, en accord avec la classification d'Islam et al.(2021). L'intégration phylogénétique a été déduite en utilisant la méthode Neighbor Joining (Saitou et Nei, 1987). Le pourcentage d'homologie dans les arbres dans lesquels sont associés ensemble les taxa mis en cluster dans le test d'amorce (1000 réplcats) sont indiqués à côté des branches (Felsenstein, 1985) Les analyses ont été réalisées dans le service du Professeur Mattia Cecchinato de l'Université de Padoue en Italie (Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute (MAPS)).

L'outil utilisé pour la représentation graphique est Google MyMaps.

3. RESULTATS

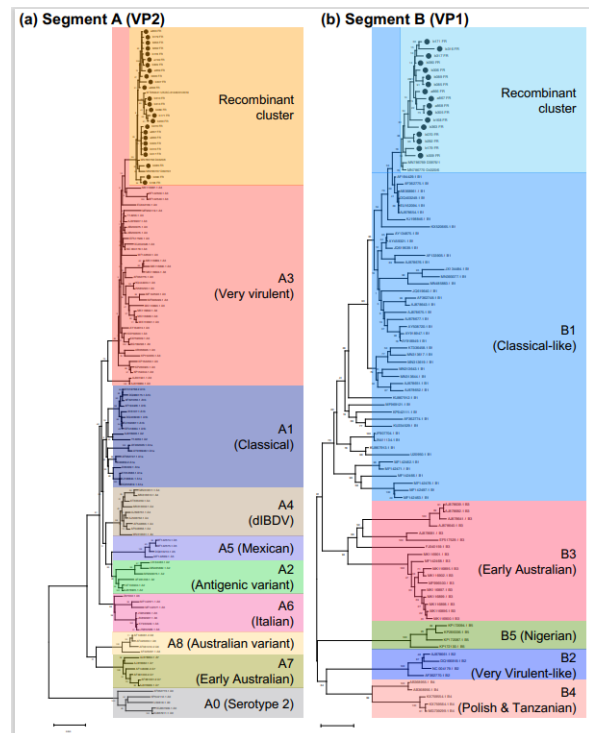
Cette étude a montré la présence de virus IBDV réassortants de type A3B1 similaires à ceux décrits par Mato et al., 2020, dans 24 sites d'élevage de poulet de chair situés dans différents bassins de production du territoire français. Ces 24 souches sont proches génétiquement et ont été classées dans un cluster particulier à la fois pour la VP1 et pour la VP2

Sur les 24 lots de poulets de chair positifs, un seul n'avait pas reçu de vaccination contre la maladie

de Gumboro. Néanmoins, le but de cette étude était d'ordre épidémiologique en premier lieu ; de ce fait, aucune analyse de corrélation avec le programme vaccinal n'a été entreprise.

Aucune autre souche de virus de la maladie de Gumboro sauvage n'a été détectée sur le terrain au cours de cette enquête épidémiologique.

Arbres phylogénétiques :



Cartographie des résultats :



4. DISCUSSION ET CONCLUSION

Cette étude montre la présence de virus de la maladie de Gumboro dans des élevages avicoles de plusieurs bassins de production du territoire français. Il semble que les souches de virus sauvage de la maladie de Gumboro, de type réassortant aient diffusé de manière large sur le territoire. Ces souches sont semblables à celles détectées dans les pays du Nord de l'Europe depuis 2017. Sur 24 cas de détection de virus sauvage de la maladie de Gumboro en France en 2021 dans le cadre de ce suivi épidémiologique, aucun autre type de virus sauvage de la maladie de Gumboro n'a été détecté. Ces virus a priori provoquent peu de signes cliniques sauf s'ils agissent en co-infection avec d'autres agents pathogènes. Ces virus réassortants ont établi des infections récurrentes dans différents pays d'Europe depuis plusieurs années. Des mutations sur certains sites antigéniques suggèrent que ces souches ont un profil antigénique altéré qui pourrait les aider à passer de plus hauts niveaux d'anticorps d'origine maternelle contre la maladie de Gumboro que les souches typiques de vvIBDV. Pour prouver cette hypothèse, des investigations sur la caractérisation antigénique des virus de ce groupe sont nécessaires.

La problématique posée par la maladie de Gumboro en élevage avicole est toujours d'actualité en France. La surveillance des populations virales est donc essentielle. La maîtrise de la biosécurité et le suivi d'un plan de vaccination adapté sont les deux piliers de la lutte contre cette maladie.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient le Professeur Mattia Cecchinato pour sa contribution technique dans l'identification des souches virales présentées dans cet article.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Chettle, N., J.C. Stuart, and P.J. Wyeth. 1989. Outbreak of virulent infectious bursal disease in East Anglia. *Vet Rec.* 125:271-272.
- Edgar RC. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. (2004). *Nucleic Acids Research*, 32: 1792–1797.
- Etteradossi, N., & Saif, Y.M. (2013). Infectious bursal disease. In D.E. Swayne, J.R. Glisson, L.R. McDougald, L.K. Nolan, D.L. Suarez & V.I. Nair (Eds). *Disease of poultry* 13th edn (pp.219-246). Hoboken, NJ : Wiley-Blackwell.
- Felsenstein J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791.
- Islam, M.R., Rahman, S., Noor, M., Chowdhury, E.H. & Müller, H. (2011). Differentiation of infectious bursal disease virus (IBDV) genome segment B of very virulent and classical lineage by RT-PCR amplification and restriction enzyme analysis. *Archives of Virology*, 157, 333-6.
- Islam MR, Nooruzzaman M, Rahman T, Mumu TT, Rahman MM, Chowdhury EH, Etteradossi N and H Müller. (2021). A unified genotypic classification of infectious bursal disease virus based on both genome segments. *Avian Pathology*, 50: 190-206.
- Jackwood, D.J. & Sommer-Wagner, S.E. (2005). Molecular Epidemiology of Infectious Bursal Disease Viruses: Distribution and Genetic Analysis of Newly Emerging Viruses in the United States. *Avian Diseases*, 49, 220-226.
- Jackwood, D.J, Schat, K.A., Michel, L.O. & de Wit, S. (2018). A proposed nomenclature for infectious bursal disease virus isolates. *Avian Pathology*, 47, 576-584
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C. & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35, 1547–1549.
- Mató T, Tatár-Kis T, Felföldi B, Jansson DS, Homonnay Z, Bányai K, Palya V. 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 Jun;245:108663. doi: 10.1016/j.vetmic.2020.108663. Epub 2020 May 4. PMID: 32456810.
- Muller, H., Scholtissek, C. & Becht, H. (1979). The genome of infectious bursal disease virus consists of two segments of double stranded RNA. *Journal of Virology*, 31, 584-589.
- Saitou N. and Nei M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4:406-425.
- Soubies, S.M., Courtillon, C., Briand, F.X., Queguiner-Leroux, M., Courtois, D., Amelot, M., Grousseau, K., Morillon, P., Herin, J.B., Etteradossi, N., 2017. Identification of a European interserotypic reassortant strain of infectious bursal disease virus. *Avian Pathol.* 46, 19-27.