

DETECTION ET CARACTERISATION DU VIRUS DE LA BRONCHITE INFECTIEUSE AU MAGHREB : PIEGES ET OPPORTUNITES

Jbenyeni Adam^{1,2}, Croville Guillaume¹, Cazaban Christophe², Guérin Jean-Luc¹

¹ IHAP, Université de Toulouse, INRAE, ENVT, Toulouse, France

² Ceva Santé Animale S.A., Libourne, France

adam.jbenyeni@envt.fr

RÉSUMÉ

Contexte : Le virus de la bronchite infectieuse (IBV) est un coronavirus aviaire responsable de troubles respiratoires, reproductifs et rénaux chez les volailles. Le virus est répandu dans le monde entier avec au moins 8 génotypes et 37 différentes lignées décrites. IBV a une grande capacité de mutation et de recombinaison ce qui nécessite une surveillance continue de ce virus. Les méthodes utilisées pour la détection et la caractérisation de ce virus doivent prendre en considération sa grande diversité génétique. La surveillance et la caractérisation de IBV en utilisant des outils adaptés est primordiale pour le contrôle de la maladie en élevage avicole.

Objectifs : Cette étude terrain visait à évaluer la contribution de IBV dans la pathologie respiratoire au Maghreb et à caractériser les souches de virus en circulation dans cette zone.

Méthodologie : Dans le cadre d'une enquête sur deux ans, 280 lots de poulets de chair présentant des signes respiratoires aigus ont été prélevés en Algérie, au Maroc et en Tunisie. La présence de IBV a été recherchée par une technique de RT-qPCR universelle ciblant la région non transcrite 5' (5'UTR). Les IBV détectés ont été par la suite séquencés en ciblant la région hyper variable 3 (HVR3) pour génotyper le virus et, le cas échéant, le différencier des souches vaccinales. En particulier, les échantillons positifs pour la souche vaccinale 1/96 ont été criblés par une RT-qPCR spécifique aux virus du groupe 793B.

Résultats : L'analyse phylogénétique a démontré la co-circulation de sept lignées de IBV dans la région du Maghreb. Ces lignées sont GI-1, -12, -13, -19, -21, -23 et une lignée "nord-africaine", non décrite jusqu'à présent. Dans les 45 lots positifs pour la souche vaccinale 1/96 du groupe 793B (GI-13), une infection concomitante par une autre souche IBV a été confirmée dans 18 lots (soit 40%).

Conclusion : Une surveillance continue de IBV est recommandée pour maintenir un niveau élevé de connaissance des nouveaux variants émergents de ces virus.

ABSTRACT

Detection and characterisation of infectious bronchitis viruses in North Africa: traps and opportunities

Background: Infectious bronchitis virus (IBV) is an avian coronavirus responsible for respiratory, reproductive and renal disorders in poultry. The virus is widespread worldwide, with at least 8 genotypes and 37 different lineages described. IBV has a great capacity for mutation and recombination, which requires continuous monitoring of the virus. The methods used to detect and characterize this virus must take account of its great genetic diversity. Monitoring and characterization of IBV using appropriate tools is essential for disease control in poultry farming.

Objectives: The aim of this field study was to assess the contribution of IBV to respiratory pathology in the North African region, and to characterize the virus strains circulating in the area.

Methodology: As part of a two-year survey, 280 flocks of broilers showing acute respiratory signs were sampled in Algeria, Morocco and Tunisia. IBV was detected using a universal RT-qPCR assay targeting the 5' untranslated region (5'UTR). IBVs detected were then sequenced targeting the hyper variable region 3 (HVR3) to genotype the virus and, where appropriate, differentiate it from vaccine strains. In addition, samples positive for vaccine strain 1/96 were screened by an RT-qPCR assay specific for 793B group viruses.

Results: Phylogenetic analysis demonstrated the co-circulation of seven IBV lineages in the North African zone. These lineages are GI-1, -12, -13, -19, -21, -23 and a "North African" lineage, not described before. Of the 45 flocks positive for 1/96 group 793B (GI-13) vaccine strain, concomitant infection with another IBV strain was confirmed in 18 of them (40%).

Conclusion: A continuous surveillance of IBV is recommended to keep a high level of awareness about new emerging variants of IBV.

INTRODUCTION

Le virus de la bronchite infectieuse (IBV) est un *Avian coronavirus* qui appartient à la famille des *Coronaviridae*, sous-famille des *Orthocoronavirinae* du genre *Gammacoronavirus* (ICTV, 2024). C'est un virus enveloppé de forme sphérique et tapissé de tiges (spicules) à sa surface lui conférant un aspect de couronne (en latin : corona). Le génome de IBV est un ARN simple brin, de polarité positive et non segmenté qui code pour quatre protéines structurales : la nucléocapside (N), la membrane (M), l'enveloppe (E) et la spicule (S) (Hogue and Machamer, 2007). Cette glycoprotéine s'auto-assemble en trimères où chaque monomère est composé de deux sous-unités, S1 et S2. La spicule est impliquée dans l'attachement et la fusion du virus avec la cellule hôte et contient des épitopes cibles de la neutralisation virale (Casais et al., 2003; Moore et al., 1997). Le génotypage et la classification des IBV sont basés principalement sur la séquence nucléotidique de la protéine S1. Valastro et al. (Valastro et al., 2016) ont proposé de classer les IBV en six génotypes (GI à GVI) qui contenaient 32 lignées, avec une diversité génétique marquée dans le GI (27 lignées). Depuis cette classification proposée en 2016, de nouveaux génotypes et lignées ont été décrits (Bali et al., 2022; Molenaar et al., 2020). En Afrique, IBV a été isolé pour la première fois dans les années 1950 en Égypte, puis dans les années 1980 en Afrique australe (Morley and Thomson, 1984). En 1983, le virus G/83 a été isolé au Maroc (El Houadfi and Jones, 1985). Une étude rétrospective a révélé que ce virus était le progéniteur de la lignée GI-13 et partageait 96% d'identité nucléotidique avec le variant 793B détecté en 1991 au Royaume-Uni. (Jones et al., 2004). Entre 1997 et 2002, d'autres virus BI néphropathogènes ont été détectés au Maroc (El Bouqdaoui et al., 2005). La souche Italy02 a été détectée pour la première fois au Maroc en 2010 et sa circulation a été notifiée jusqu'en 2014 par Fellahi et al. (Fellahi et al., 2015). En Algérie, un nouveau variant néphropathogène de BI a été détecté en 2012 (Lounas et al., 2018) et en 2013 (Sid et al., 2015). En Tunisie, des variants uniques du virus BI ont été caractérisés au cours des périodes 2000-2001 et 2007-2010 (Bourogaa et al., 2012, 2009). En 2016, des virus étroitement liés au variant néphropathogène algérien ont été identifiés et isolés en Tunisie (Lachheb et al., 2019). Cette étude terrain a pour objectif d'évaluer la contribution de IBV dans la pathologie respiratoire au Maghreb et de génotyper les virus en circulation dans cette zone.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Collecte d'échantillons

Entre décembre 2020 et décembre 2022, 280 lots de poulets de chair présentant des signes cliniques aigus de maladie respiratoire au Maghreb ont été échantillonnés maximum cinq jours après l'apparition de ces signes. Le nombre de lots échantillonnés au Maroc, en Algérie et en Tunisie était respectivement de 136, 81 et 63. Douze écouvillons trachéaux par lot ont été prélevés et étalés immédiatement sur une carte FTA® à quatre cercles (Qiagen, Hilden, Allemagne), à raison de trois écouvillons par cercle. Les échantillons du même cercle ont été poolés pour finir avec quatre points à analyser par lot.

1.2. RT-qPCR 5'UTR et séquençage de la HVR3 du gène S1

Une analyse RT-qPCR ciblant la région 5' non traduite (5'UTR) et permettant la détection universelle de IBV a été utilisée. Les amorces sens et antisens décrites par Callison et al. (Callison et al., 2006) ont été utilisées à l'aide de la chimie Sybr®Green. Un échantillon par lot positif a été sélectionné pour le séquençage partiel du gène S1 en technologie Sanger en amplifiant un fragment de 300pb de la zone hypervariable 3 (HVR3) et en utilisant les amorces décrites par Worthington et al. (Worthington et al., 2008). Seuls les échantillons avec une valeur de Ct inférieure à 32 ont été sélectionnés pour le séquençage. Des Ct supérieur à cette valeur correspondent en effet à moins d'une copie de génome (d'après la gamme utilisée pour la quantification), ne garantissant pas un résultat de séquençage exploitable.

1.3. Analyse phylogénétique et classification

L'alignement des séquences a été réalisé sur la plateforme MAAFT (Multiple Alignment, Fast Fourier Transform) (Kato et al., 2019). Les séquences S1 du progéniteur de chaque génotype et lignée de IBV ont été incluses comme séquences de référence dans l'analyse phylogénétique. Le pourcentage de similarité entre les séquences nucléotidiques et l'arbre des relations phylogénétiques ont été inférés en utilisant la méthode du maximum de vraisemblance sur le logiciel Mega X.

1.4. RT-qPCR ciblant la souche vaccinale 793B

Une RT-qPCR spécifique à la souche vaccinale 793B-1/96 a été utilisée pour cribler les échantillons génotypés 793B-1/96 afin de distinguer la souche vaccinale d'une souche d'IBV d'une autre lignée qui serait naturellement présente dans l'échantillon (Tucciarone et al., 2018). Afin de définir le Δ Ct à partir duquel on peut prédire la présence d'une deuxième souche IBV, cette 793B-1/96 RT-qPCR a été utilisée en même temps que la 5' UTR RT-qPCR sur des dilutions en série d'un échantillon de vaccin. Le Δ Ct entre les deux RT-qPCR sur le vaccin a ainsi

été établi à 2,2 ; c'est pourquoi un seuil de 3 Δ Ct a été fixé pour prédire la présence d'une deuxième souche d'IBV.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

Au cours de cette étude menée entre décembre 2020 et décembre 2022, 55,7% (156/280) des lots étudiés ont été trouvés positifs en IBV. Le taux de positivité à IBV était de 69 %, 64 % et 44 % en Algérie, en Tunisie et au Maroc respectivement. Parmi ces trois pays, des études similaires avaient été préalablement conduites uniquement au Maroc et avaient montré qu'entre 2010 et 2014, le taux de positivité de IBV dans des cas d'infections respiratoires était de 51,7% (Fellahi et al., 2015). Sur les 156 lots trouvés positifs dans cette étude, 116 IBV ont été génotypés. Pour les 40 lots restants, nous n'avons pas été en mesure d'amplifier le gène S1 partiel des échantillons IBV positifs, bien que la charge d'ARN viral fût suffisamment élevée. Sur la base des résultats de séquençage, sept lignées du génotype I (GI) ont été identifiées en Afrique du Nord. Il s'agit des lignées GI-1, -12, -13, -19, -21, -23 et une lignée "nord-africaine" regroupant des souches détectées dans le cadre de cette étude et non décrites précédemment (Figure 1). Des virus affiliés aux lignées GI-13 et GI-1 ont été identifiés respectivement dans 62 et 14 lots au total. Des virus de lignée GI-19 ont été détectés en Algérie et en Tunisie respectivement dans 11 et 2 lots. La circulation de la lignée GI-19 (QX) en Algérie et en Tunisie n'avait pas été décrite avant cette étude. L'analyse phylogénétique suggère que les virus GI-19 Algériens et Tunisiens ont un ancêtre en commun qui est éloigné des souches vaccinales L1148 ou D388 de la même lignée. Les virus de lignée "nord-africaine" ont été détectés en Algérie et au Maroc dans 5 lots chacun. Ils présentent une grande identité nucléotidique et un lien phylogénétique avec des virus décrits précédemment en Algérie et au Maroc, mais mal classifiés. L'analyse phylogénétique a regroupé tous ces virus dans un cluster que nous avons nommé

lignée "nord-africaine". Les virus de la lignée GI-21 ont été détectés uniquement au Maroc dans 10 lots. Ces virus représentent une distance nucléotidique de 5% sur 300pb. Cette lignée a été détectée pour la première fois en 2010. Cette étude montre que les virus de cette lignée circulent encore et qu'ils ont évolué sur le plan génétique par rapport au premier virus GI-21 décrit au Maroc (Fellahi et al., 2015). Un virus de la lignée GI-12 a été détecté uniquement au Maroc dans un seul lot. La lignée GI-23 (1 lot) a été trouvée uniquement en Tunisie ce qui confirme sa première notification en 2019. Cependant sa détection semble sporadique et ne suggère pas que le virus de cette lignée soit répandu sur tout le territoire tunisien (Jbenyeni et al., 2023). Parmi les 62 lots positifs pour un virus de lignée GI-13, 45 étaient 100% identiques à la souche vaccinale 793B-1/96. La RT-qPCR ciblant la souche vaccinale a montré que 18 de ces 45 lots présentaient un Δ Ct supérieur à 3. Ces résultats suggèrent une présence concomitante de deux lignées de virus. Cela peut être expliqué par une spécificité plus élevée des amorces utilisées pour le séquençage pour certaines lignées comme celles des souches vaccinales. Cette différence de sensibilité entre les lignées peut fausser l'identification du virus qui est à l'origine du signal fort par la RT-qPCR 5'UTR. D'autres investigations sont nécessaires pour identifier la ou les virus présents en parallèle de la souche vaccinale.

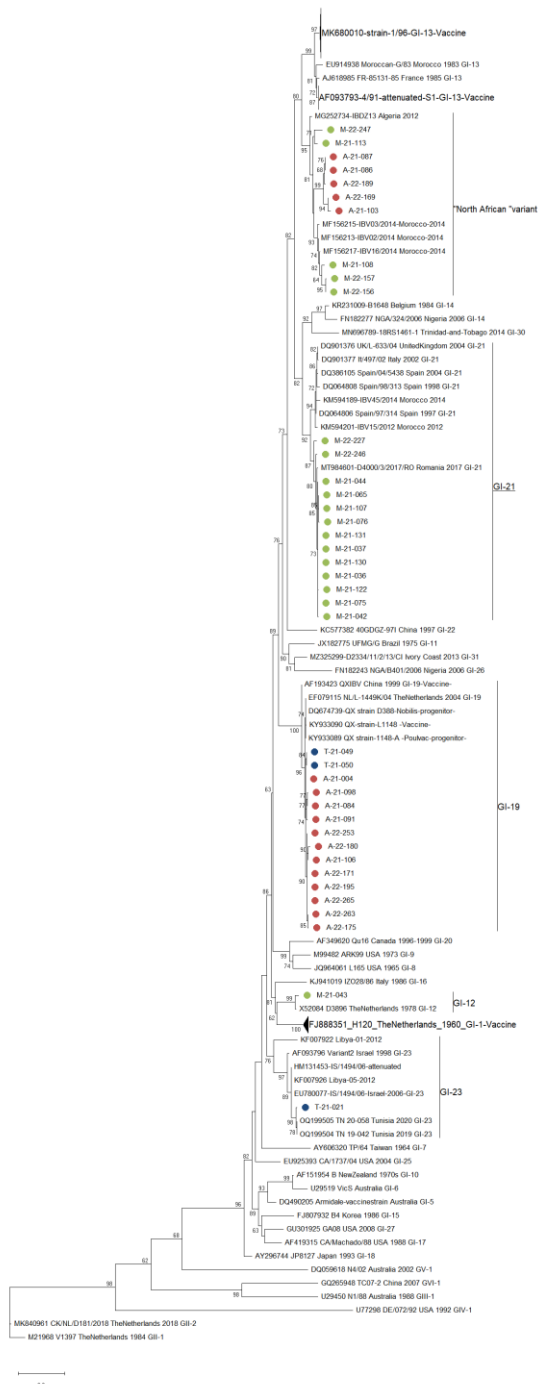
CONCLUSION

En Algérie et en Tunisie, l'épidémiologie de IBV est peu décrite, c'est pour cela que cette étude est d'une grande importance et constitue la plus grande enquête menée dans ces deux pays à ce jour. Dans cette étude, nous avons montré qu'environ la moitié des cas respiratoires investigués lors de cette étude au Maghreb étaient positifs pour IBV. Cette étude a également montré la co-circulation de sept lignées de IBV et a permis leur caractérisation.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Bali, K., Kaszab, E., Marton, S., Hamdiou, S.H., Bentaleb, R.K., Kiss, I., Palya, V., Bányai, K., 2022. *Life* (Basel) 12, 475.
- Bourogâa, H., Hellal, I., Hassen, J., Fathallah, I., Ghram, A., 2012. *Veterinary Medicine: Research and Reports* 41.
- Bourogâa, H., Miled, K., Gribâa, L., Behi, I.E., Ghram, A., 2009. *Avian Diseases* 53, 426–433.
- Callison, S.A., Hilt, D.A., Boynton, T.O., Sample, B.F., Robison, R., Swayne, D.E., Jackwood, M.W., 2006. *Journal of Virological Methods* 138, 60–65.
- Casais, R., Dove, B., Cavanagh, D., Britton, P., 2003. *Journal of Virology* 77, 9084.
- El Bouqdaoui, M., Mhand, R.A., Bouayoune, H., Ennaji, M.M., 2005. *International Journal of Poultry Science* 4, 721–727.
- El Houadfi, M., Jones, R.C., 1985. *Veterinary Record* 116, 445–445.
- Fellahi, S., Ducatez, M., Harrak, M.E., Guérin, J.-L., Touil, N., Sebbar, G., Bouaiti, E.A., khataby, K., Ennaji, M.M., El-Houadfi, M., 2015. *Avian Pathology* 44, 287–295.
- Hogue, B.G., Machamer, C.E., 2007, in: *Nidoviruses*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 179–200.
- ICTV, 2024. Genus: Avian coronavirus | ICTV URL
https://ictv.global/taxonomy/taxondetails?taxnode_id=202201879&taxon_name=Gammacoronavirus (accessed 2.7.24).
- Jbenyeni, A., Croville, G., Cazaban, C., Guérin, J.-L., 2023. *Veterinary Research* 54, 88.
- Jones, R.C., Savage, C.E., Naylor, C.J., Cook, J.K.A., El-Houadfi, M., 2004., in: IV. International Symposium on Avian Corona-and Pneumovirus Infections, pp. 105–111.
- Katoh, K., Rozewicki, J., Yamada, K.D., 2019. *Brief Bioinform* 20, 1160–1166.
- Lachheb, J., Turki, A., Nsiri, J., Fathallah, I., El behi, I., Larbi, I., Ghram, A., 2019. *Poultry Science* 98, 4338–4345.
- Lounas, A., Oumouna-Benachour, K., Medkour, H., Oumouna, M., 2018. *Vet World* 1630–1636.
- Molenaar, R.J., Dijkman, R., de Wit, J.J., 2020. *Avian Pathology* 49, 243–250.
- Moore, K.M., Jackwood, M.W., Hilt, D.A., 1997. *Arch. Virol.* 142, 2249–2256.
- Morley, A.J., Thomson, D.K., 1984. *Avian Diseases* 28, 238–243.
- Sid, H., Benachour, K., Rautenschlein, S., 2015. *Avian Dis.* 59, 440–446.
- Tucciarone, C.M., Franzo, G., Berto, G., Drigo, M., Ramon, G., Koutoulis, K.C., Catelli, E., Cecchinato, M., 2018. *Poult Sci* 97, 303–312.
- Valastro, V., Holmes, E.C., Britton, P., Fusaro, A., Jackwood, M.W., Cattoli, G., Monne, I., 2016. *Infection, Genetics and Evolution* 39, 349–364.
- Worthington, K.J., Currie, R.J.W., Jones, R.C., 2008. *Avian Pathol.* 37, 247–257.

Figure 1. Arbre phylogénétique des IBV caractérisés au Maghreb



Arbre phylogénétique basé sur les séquences nucléotidiques HVR3 du gène S1. Les virus détectés au Maroc, en Algérie et en Tunisie ont été identifiés respectivement par des cercles verts, rouges et bleus. La lignée « nord-africaine » correspond à un ensemble de souches détectées dans le cadre de cette étude et ne correspondant pas à une lignée précédemment décrite. Seules les lignées détectées dans le cadre de cette étude sont présentées dans l'arbre.